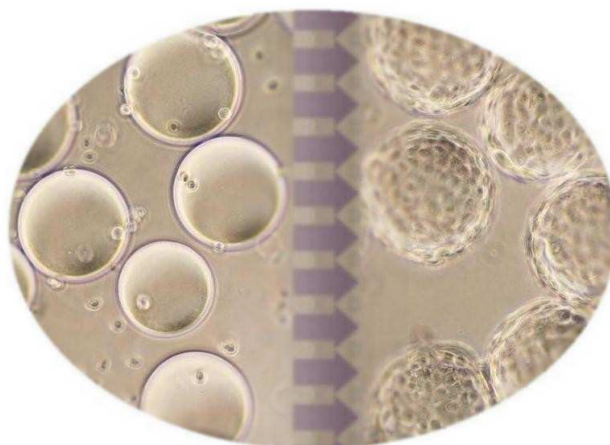


Université
de Liège



LGC
CHEMICAL
ENGINEERING

**Étude de l'hydrodynamique au sein d'un bioréacteur
à cuve agitée utilisé pour la culture de cellules
animales adhérentes sur microporteurs :
Caractérisation expérimentale et théorique des
écoulements *via* des outils eulériens et lagrangiens**



Thèse présentée par Marie-Laure Collignon en vue de
l'obtention du grade de docteur en sciences de l'ingénieur

Université de Liège
Faculté des Sciences Appliquées
Département de Chimie Appliquée
Laboratoire de Génie Chimique
Ecole doctorale GEPROC

2012

Jury :

M. Jean-Paul PIRARD, Professeur Ordinaire à l'ULg, Président

M^{me} Dominique TOYE, Chargée de cours à l'ULg, Co-promotrice

M. Michel CRINE, Professeur Ordinaire à l'ULg, Co-promoteur

M. Georges HEYEN, Professeur à l'ULg

M. Pierre MARCHOT, Professeur à l'ULg

M. Frank DELVIGNE, Chargé de cours à l'ULg

M. Tristan GILET, Chargé de cours à l'ULg

M. Benoit HAUT, Professeur à l'ULB

M. Eric OLMOS, Maître de Conférences à l'INPL-ENSAIA

M^{me} Sandrine DESSOY, Experte scientifique GlaxoSmithKline Biologicals

Résumé

Étude de l'hydrodynamique au sein d'un bioréacteur à cuve agitée utilisé pour la culture de cellules animales adhérentes sur microporteurs :

Caractérisation expérimentale et théorique des écoulements *via* des outils eulériens et lagrangiens

Thèse présentée par Marie-Laure Collignon en vue de l'obtention du grade de docteur en sciences de l'ingénieur de l'Université de Liège

Cette thèse a été financée par le FNRS (Fonds National de Recherche Scientifique belge) *via* un mandat d'aspirant (1.1.2002.10.F, 78014). Elle a été réalisée au Laboratoire de Génie Chimique de l'Université de Liège sous la supervision des Professeurs Dominique Töye et Michel Crine. La thématique de recherche s'inscrit dans le cadre d'une collaboration scientifique entretenue depuis de nombreuses années entre le Laboratoire de Génie Chimique et la société pharmaceutique GlaxoSmithKline Biologicals. Elle concerne la culture de cellules animales adhérentes sur microporteurs en bioréacteur de type cuve agitée. Ce type de procédé est, en effet, largement utilisé dans l'industrie pharmaceutique pour produire des composés protéinés tels que des vaccins, des glycoprotéines et des anticorps monoclonaux. Le choix du design et des conditions d'agitation de ce type de bioréacteur est complexe car il doit répondre à deux objectifs antagonistes : maximiser le mélange du milieu de culture tout en minimisant les contraintes mécaniques qui peuvent agir sur les cellules animales, ces dernières étant réputées comme particulièrement sensibles à ces contraintes lorsqu'elles sont fixées à la surface de microporteurs. Pour aider à réaliser ce choix, nous avons développé dans cette thèse une méthodologie qui tente de décrire l'influence des conditions d'agitation sur l'environnement hydrodynamique local perçu par un élément de fluide en mouvement *via* une description combinée eulérienne et lagrangienne de l'écoulement turbulent au sein du bioréacteur.

Le Chapitre I a pour but de présenter l'état de l'art relatif à la culture de cellules animales adhérentes dans des bioréacteurs à cuve agitée, ainsi que d'introduire l'essentiel des notions théoriques qui seront utilisées dans la suite de la thèse. Il est divisé en quatre parties. La première partie présente les spécificités de la culture de cellules animales de mammifères et les défis technologiques associés. La deuxième partie introduit, en se basant sur diverses études antérieures, le problème central de cette thèse. La troisième partie présente l'approche adoptée dans cette thèse pour répondre au problème posé. L'originalité de l'approche adoptée est également mise en évidence. Dans la quatrième partie, les hypothèses nécessaires à ce travail sont présentées et validées sur base de résultats issus d'autres études publiées dans la littérature.

Le Chapitre II a pour but de sélectionner deux mobiles axiaux auxquels sera appliquée la méthodologie développée dans cette thèse. Pour ce faire, sept mobiles axiaux sont comparés sur base des contraintes mécaniques qu'ils génèrent, estimées à partir de la mesure de la puissance globale dissipée, lorsqu'ils tournent respectivement à leur vitesse minimale de maintien des microporteurs en suspension complète N_{js} . Cette comparaison permet de sélectionner les mobiles TTP 125 ($d/T=0.4$, Mixel) et EE 150 ($d/T=0.5$, Applikon).

Le Chapitre III est consacré à l'étude eulérienne détaillée de l'écoulement turbulent généré par les deux mobiles sélectionnés au chapitre précédent. Sur base de mesures 3D P.I.V., les champs moyens de vitesse dans cinq plans axiaux sont établis et analysés. Ce même exercice est réalisé pour les grandeurs caractéristiques de la composante turbulente de l'écoulement que sont l'énergie cinétique turbulente et son taux de dissipation. Grâce à ces données, la répartition spatiale des contraintes mécaniques au sein de l'écoulement turbulent est établie ; ce qui permet d'identifier au sein de la cuve des zones labélisées comme potentiellement problématiques pour le développement des cellules cultivées sur les microporteurs.

Dans le Chapitre IV, l'impact de gradients de concentration présents au sein de la cuve, suite à une injection de soude par exemple, est évalué. Dans ce but, le mélange au sein du bioréacteur a été étudié de manière globale par la mesure de temps de mélange et de manière locale par la mesure de l'évolution avec le temps de champs de concentration par la technique P.L.I.F. Ces mesures ont montré que le temps d'« existence » des gradients de concentration est nettement inférieur aux temps caractéristiques relatifs à une modification du métabolisme cellulaire. Il en résulte que, dans la suite du travail, les champs de concentration seront supposés comme constants et uniformes au sein de la cuve agitée. Les hétérogénéités ponctuellement présentes après l'ajout de soude ne seront donc pas prises en compte dans la caractérisation Euler-Lagrange de l'écoulement.

La première partie du Chapitre V présente le principe et les outils de modélisation nécessaires à la mise au point et au fonctionnement du dispositif de trajectographie optique conçu et développé dans le cadre de cette thèse. Cette installation, tout à fait originale et unique, permet de suivre la trajectoire d'une particule au sein de la cuve agitée pendant des temps très longs et permet donc d'accéder à l'étude lagrangienne de l'écoulement. La seconde partie du chapitre est consacrée à la caractérisation des trajectoires mesurées. L'isoprobabilité de présence de la particule dans tout volume élémentaire de la cuve agitée a pu être confirmée. La validité et la convergence des résultats obtenus par trajectographie ont pu être vérifiées par comparaison des champs de vitesse calculés à partir des trajectoires avec ceux mesurés par 3D P.I.V.

Au Chapitre VI, les données eulériennes sont combinées aux données lagrangiennes afin de caractériser le lien entre la succession d'environnements hydrodynamiques perçus par des cellules fixées sur des microporteurs et les conditions d'agitation du bioréacteur. Cette caractérisation repose principalement sur l'analyse de la distribution de temps de séjour de la particule dans la zone labélisée comme problématique pour le développement cellulaire DTS_{zone} , de la distribution de temps de séjour de la particule dans la zone non problématique $DTS_{hors\ zone}$ ainsi que sur l'analyse des distributions de temps mis par la particule pour réaliser un cycle « visite de zone problématique-visite de zone non problématique » DT_{cycle} . La taille des zones problématiques et non problématiques dépend de la valeur choisie pour le critère λ_K/d_p , du type de mobile, ainsi que de sa vitesse de rotation. L'impact de ces trois grandeurs sur les distributions de temps a donc été analysé.

Cette thèse se clôture bien naturellement par un chapitre de conclusion résumant les informations acquises et proposant diverses perspectives.

Remerciements

Par ces quelques lignes, je souhaite remercier toutes les personnes qui m'ont aidée et soutenue pendant ce travail de thèse. Si je suis parvenue au terme de celui-ci, c'est en grande partie grâce à leur soutien et leurs encouragements. Dès lors, à mes yeux, ce projet de recherche n'est pas que le mien mais également le leur.

En premier lieu, je tiens à remercier mes deux promoteurs de thèse, Dominique Toye et Michel Crine, sans qui cette thèse n'aurait jamais eu lieu. Merci de m'avoir offert cette opportunité et de m'avoir accordé votre confiance. Merci d'avoir passé de nombreuses heures à me former, sans parler des nombreuses autres passées à relire et corriger ce manuscrit de thèse. Je souhaiterais faire une petite dédicace personnelle à Dominique. Pendant toutes ces années, tu as été mon mentor scientifique. En permanence, tu as été la promotrice dont j'ai toujours rêvé. Tu m'as laissé un vaste champ de liberté pour que j'apprenne à devenir une chercheuse autonome mais tu as toujours été immédiatement disponible lorsque je rencontrais de petits ou gros problèmes, même si ton planning était déjà bien occupé par d'autres tâches. Tu sais à quel point je t'apprécie, que cela soit dans un cadre professionnel ou plus personnel. Je pense que tous les chercheurs du laboratoire s'associent à moi pour reconnaître tes énormes qualités humaines, ta capacité de travail, tes jugements et conseils avisés qui font que c'est un réel plaisir de travailler avec toi.

Je tiens ensuite à remercier les membres de mon jury d'avoir accepté de consacrer une partie de leur temps précieux à lire et évaluer ce travail. Je me réjouis de pouvoir échanger avec vous sur ce travail lors de sa défense orale. Un merci particulier au Professeur Pirard d'avoir accepté de présider ce jury, d'avoir accepté de lire ce manuscrit avant son dépôt et de m'avoir conseillé de judicieuses corrections.

Avant de remercier les nombreuses personnes que j'ai rencontrées et côtoyées professionnellement et parfois plus amicalement pendant ces années de thèse, j'aimerais d'abord remercier de tout cœur ma petite « tribu ». Commençons par mon mari, Thibaut. Tu m'as supportée au quotidien, ce qui n'a pas été tous les jours une mince affaire. On a partagé des moments merveilleux mais on a aussi traversé des moments difficiles à cause de cette thèse. Tu es passé avec moi par le panel d'émotions que tout doctorant rencontre : joie, motivation, doute, désespoir, soulagement, bonheur. Quand je vois ce qu'un conjoint doit supporter pendant la thèse de son épouse, je comprends mieux pourquoi en Allemagne, on lui attribue aussi le titre de « Herr Doktor ». En tout cas, je te remercie pour ta patience, je t'aime et je te promets que les choses vont changer. J'aimerais ensuite remercier mes parents, Viviane et Dany, et ma grande sœur, Anne-Sophie, qui m'encouragent et me soutiennent dans tous mes projets depuis déjà 28 ans. Merci d'avoir toujours répondu présent et pour tout le bonheur que vous apportez dans ma vie. Merci également à mon beau-frère Reinoud et ses 4 petits bouts de choux, Tristan, Armelle, Auriane et Gilou. Vous êtes un véritable arc-en-ciel dans cette famille. Je tiens également à remercier ma belle-mère, Nadine, et ses parents, Papy et Mamy, d'avoir fait de Thibaut l'homme qu'il est aujourd'hui et de m'avoir accueillie dans votre famille comme votre fille. Vous savez que dans mon cœur, c'est réciproque. Je termine ce tour de famille en remerciant aussi mes deux grands-mères, Marraine et Nainaine. Je tiens également à mettre à l'honneur mes amis qui ont pris soin de ma santé mentale en me proposant régulièrement des activités de loisirs. Merci à

Alex, Astrid, Bernard, Cédric et à leur conjoint respectif. Merci aussi aux Chimistes et aux Plongeurs.

Revenons à un cadre un peu plus professionnel. Le Laboratoire de Génie Chimique est un lieu où il fait bon travailler car les personnes s'entraident et sont plus que de simples collègues. Merci particulièrement à Dominique, Emeline, Sylvie, Thierry, Laurent, Sébastien et Angélique pour tous ces moments partagés pendant ces années. Merci aussi aux nouveaux, Charlotte, Yvon, Lies et Françoise, que je connais un peu moins bien mais dont j'espère faire plus ample connaissance à l'avenir. Merci également aux anciens qui sont partis vers d'autres horizons : Djomice, Saïd et Joachim. Merci aussi à Frédéric, notre technicien, à Thierry et Sébastien, nos bricoleurs, pour avoir réussi à fabriquer tous les objets que je vous ai demandés même si parfois mes idées étaient peu claires ou biscornues. Je tiens également à joindre à cette liste de personnes, tous les stagiaires et étudiants qui sont passés momentanément dans le laboratoire et qui ont contribué à sa vie et son dynamisme. Enfin, merci aux Professeurs Crine et Marchot pour les nombreuses pauses cafés (ou thés) pendant lesquelles vous avez développé un art certain pour lancer les conversations sur des sujets scientifiques très intéressants.

Je tiens également à adresser mes remerciements à tous les membres du Département de Chimie Appliquée. Même, si nous sommes parfois perçus à l'extérieur comme le village d'irréductibles gaulois, à l'intérieur, c'est une équipe qui travaille ensemble et où chaque membre contribue à améliorer l'enseignement et son domaine de recherche. C'est très motivant de faire partie de cet ensemble. Merci également à l'équipe encadrante de m'avoir formée durant mes études et de me faire confiance en m'offrant à mon tour l'opportunité de participer à la formation des futurs ingénieurs.

Je continuerais en remerciant toutes les personnes avec qui j'ai eu l'opportunité de travailler dans le cadre de collaboration scientifique et que je n'ai pas encore remerciées. Commençons par le Professeur Grandfils, son épouse et tous les membres de son équipe qui m'ont à chaque fois accueillie comme si j'étais un membre à part entière de leur laboratoire lorsque j'ai eu besoin d'utiliser leur installation de microscopie optique et leur générateur de gouttes à courant d'air coaxial. Merci pour votre accueil et pour les nombreux conseils prodigués. Merci aussi à Sandrine Dessoay, Ludovic Peeters et Raphaël Gillet de la société GlaxoSmithKline Biologicals. Cela a été vraiment un honneur, un plaisir et une source de motivation importante de collaborer avec vous. J'espère que par la suite nous pourrions continuer à collaborer sur d'autres projets. Merci enfin à Frank Delvigne et au Professeur Thonart pour la collaboration que nous avons eue dans le cadre du projet FRFC.

Je n'oublierais pas de remercier les collègues de ma maman avec qui j'ai passé régulièrement d'agréables temps de midi durant ces années de thèse. Merci donc à Catherine, Hubert, Marie-Noëlle, Corentin et Mélanie.

Enfin, je ne peux finir ces remerciements, sans penser au FNRS et à l'Université de Liège qui ont mis à ma disposition les moyens financiers et matériels nécessaires pour que les travaux menés durant cette thèse se passent pour un mieux et qui m'ont permise à de nombreuses reprises de présenter mes recherches dans des colloques internationaux.

Table des matières

Résumé.....	5
Remerciements	9
Table des matières	13
Chapitre I : <i>Introduction et état de l'art</i>.....	19
Résumé	20
1 Spécificités de la culture de cellules animales	21
2 Définition du problème	25
2.1 Description de la structure de l'écoulement turbulent au sein d'une cuve agitée	26
2.2 Mécanisme d'interaction entre l'écoulement turbulent et les cellules animales fixées sur les microporteurs	31
3 Approche proposée.....	38
3.1 Méthodologie	38
3.2 Originalité de l'approche	39
4 Hypothèses de travail	41
5 Structure de la thèse.....	43
Liste des symboles	46
Table des figures.....	47
Bibliographie	48
Chapitre II : <i>Sélection de mobiles axiaux pour la culture de cellules animales adhérentes sur microporteurs dans un bioréacteur à cuve agitée : Méthodologie basée sur la comparaison des mobiles à leur vitesse minimale de maintien des microporteurs en suspension complète N_{js}</i>.....	55
Résumé	56
1 Introduction	57
2 Appareils et méthodes	60
2.1 Design de la cuve.....	60
2.2 Caractérisation des microporteurs et N_{js}	62
2.3 Dispositif 2D P.I.V.	63
2.4 Puissance globale dissipée	66
2.5 Caractérisation des contraintes mécaniques.....	67
3 Résultats	69
3.1 Comparaison des sept mobiles à leur vitesse de rotation respective N_{js}	69
3.2 Comparaison des sept mobiles à des vitesses de rotation N correspondant à des facteurs multiplicatifs de N_{js}	76
4 Conclusion.....	78
Annexe II-1 : Traitement appliqué sur les images brutes acquises par la caméra P.I.V. pour obtenir les champs instantanés de vitesse	80
Annexe II-2 : Mise en évidence de la nature turbulente de l'écoulement dans les conditions d'agitation étudiées dans ce travail.....	84
Liste des symboles	93
Table des figures.....	95
Table des tableaux.....	97
Bibliographie	98

Chapitre III :	Caractérisation eulérienne de l'écoulement turbulent généré par les mobiles TTP 125 et EE 150 dans le bioréacteur à cuve agitée utilisé en culture de cellules animales sur microporteurs.....	103
Résumé.....		104
1	Introduction.....	107
2	Appareils, méthodes et validation.....	108
2.1	3D P.I.V.	108
2.2	Validation des mesures 3D P.I.V.	114
3	Caractérisation de la composante moyenne de l'écoulement.....	120
3.1	Description qualitative des champs moyens générés par les mobiles TTP 125 et EE 150	121
3.2	Orientation de la composante principale de l'écoulement moyen.....	124
3.3	Distribution numérique des champs moyens	125
3.4	Effet des deux contre-pales sur la structure de l'écoulement moyen.....	126
3.5	Synthèse	132
4	Caractérisation de la composante turbulente de l'écoulement	132
4.1	Distribution de l'énergie cinétique turbulente.....	132
4.2	Distribution du taux de dissipation de l'énergie cinétique turbulente	138
4.3	Synthèse	150
5	Contraintes mécaniques générés au sein de l'écoulement turbulent	150
6	Découpage de la cuve sur base du niveau de contraintes mécaniques.....	154
7	Conclusion.....	159
7.1	Synthèse	159
7.2	Discussions	160
Annexe III-1 :	Validation des mesures 3D P.I.V. : résultats relatifs au mobile EE 150	162
Liste des symboles.....		165
Table des figures		167
Table des tableaux		174
Bibliographie		175
Chapitre IV :	Caractérisation du mélange généré par les mobiles TTP 125 et EE 150 au sein du bioréacteur à cuve agitée utilisé en culture de cellules animales sur microporteurs	179
Résumé.....		180
1	Introduction.....	181
2	Description globale du mélange <i>via</i> le temps de mélange	182
2.1	Appareils et méthodes.....	182
2.2	Résultats	183
3	Caractérisation locale du mélange <i>via</i> l'analyse des mesures P.L.I.F.	185
3.1	La technique expérimentale P.L.I.F.....	185
3.2	Analyse des champs instantanés de concentration	189
4	Discussion des résultats en relation avec les données disponibles sur le métabolisme des cellules animales.....	201
Annexe IV-1 :	Détermination de temps de mélange <i>via</i> la technique P.L.I.F.....	205
Liste des symboles.....		207
Table des figures		208
Table des tableaux		210
Bibliographie		211

Chapitre V : Caractérisation lagrangienne de l'écoulement turbulent généré par les mobiles TTP 125 et EE 150 au sein du bioréacteur à cuve agitée utilisé en culture de cellules animales sur microporteurs..... 213

Résumé	214
1 Introduction	216
2 Conception du dispositif de trajectographie optique	216
2.1 Principe général de fonctionnement	216
2.2 Description du matériel	218
2.3 Modélisation du dispositif.....	226
2.4 Algorithme de tri et de construction des trajectoires	241
3 Caractérisation des trajectoires obtenues	246
3.1 Structure des trajectoires	246
3.2 Isoprobabilité de présence et symétrie.....	249
3.3 Validation et convergence.....	253
4 Conclusion.....	261
Liste des symboles	262
Table des Figures.....	264
Table des Tableaux	268
Bibliographie	269

Chapitre VI : Caractérisation par une approche combinée Euler-Lagrange de l'écoulement turbulent généré par les mobiles TTP 125 et EE 150 au sein du bioréacteur à cuve agitée utilisé en culture de cellules animales sur microporteurs..... 271

Résumé	272
1 Introduction	273
2 Distribution de temps de séjour de la particule dans la zone labélisée comme problématique pour le développement cellulaire	274
2.1 Méthodologie	274
2.2 Résultats.....	278
3 Superposition des trajectoires et des champs de la moyenne des contraintes normales	287
3.1 Méthodologie	287
3.2 Résultats.....	288
4 Conclusion.....	290
Liste des symboles	293
Table des figures.....	294
Table des tableaux.....	296
Bibliographie	297

Chapitre VII : Conclusion..... 299

1 Synthèse et discussion.....	300
2 Perspectives.....	304
2.1 Trajectographie	304
2.2 Simulation numérique de l'écoulement.....	306
2.3 Mot de la fin.....	307
Bibliographie	308

Liste des publications

1 Collaborations scientifiques.....	312
--	------------

2	Publications.....	312
2.1	Articles dans des revues scientifiques avec peer reviewing en tant que 1 ^{er} auteur.....	312
2.2	Articles dans des revues scientifiques avec peer reviewing en tant que co-auteur.....	313
2.3	Actes de conférence en tant que 1 ^{er} auteur	313

Chapitre I :

Introduction et état de l'art

Résumé.....	20
1 Spécificités de la culture de cellules animales.....	21
2 Définition du problème.....	25
2.1 Description de la structure de l'écoulement turbulent au sein d'une cuve agitée	26
2.2 Mécanisme d'interaction entre l'écoulement turbulent et les cellules animales fixées sur les microporteurs	31
3 Approche proposée.....	38
3.1 Méthodologie.....	38
3.2 Originalité de l'approche	39
4 Hypothèses de travail.....	41
5 Structure de la thèse.....	43
Liste des symboles.....	46
Table des figures	47
Bibliographie	48

Résumé

Le présent travail de thèse s'appuie sur les observations suivantes : les cellules animales de mammifères sont cultivées en bioréacteurs par les sociétés pharmaceutiques pour produire des composés protéinés. Ce marché est en explosion depuis les années 1980 mais il continue à subir une forte pression suite à une demande sans cesse croissante. De plus, la culture à l'échelle industrielle de cellules animales représente un vrai défi technologique où de nombreux verrous ont été ou doivent encore être levés. Ces verrous sont de diverses natures. Ils peuvent se situer au niveau du design du bioréacteur, au niveau de la composition du milieu de culture ou encore au niveau des caractéristiques mêmes des cellules.

Ce chapitre introductif a pour but de présenter l'état de l'art relatif à la culture de cellules animales adhérentes dans des bioréacteurs à cuve agitée, ainsi que d'introduire l'essentiel des notions théoriques qui seront utilisées dans la suite de la thèse. Il est divisé en cinq parties.

La première partie a pour objectif de présenter les spécificités de la culture de cellules animales de mammifères et les défis technologiques associés.

La seconde partie introduit, en se basant sur diverses études antérieures, le problème central de cette thèse : il s'agit de la difficulté de définir le design et les conditions opératoires d'un bioréacteur à cuve agitée adapté à la culture de cellules animales adhérentes sur microporteurs. En effet, il faut mélanger le milieu de culture pour en homogénéiser la composition, pour favoriser le transfert de matière vers les cellules et pour maintenir les microporteurs en suspension. Cependant, les cellules animales sont très sensibles aux contraintes mécaniques générées par l'écoulement turbulent de la phase liquide. Le choix du design du bioréacteur et de ses conditions opératoires doit donc résulter d'un compromis entre le besoin de mélange et la nécessité de limiter les contraintes mécaniques. Ce choix n'est pas aisé.

La troisième partie présente l'approche adoptée dans cette thèse pour répondre au problème posé. Il s'agit du développement d'une méthodologie qui caractérise l'environnement hydrodynamique et qui aide ainsi à sélectionner le design et les conditions opératoires d'un bioréacteur répondant aux besoins de cellules animales cultivées sur microporteurs. L'accent est porté sur l'influence des conditions d'agitation sur l'environnement hydrodynamique local perçu par un élément de fluide en mouvement. Pour ce faire, une description eulérienne de l'écoulement, obtenue par des mesures de stéréo-P.I.V., est couplée à une description lagrangienne, obtenue par des mesures de trajectographie. Dans cette troisième partie, l'originalité de l'approche proposée est mise en évidence.

La quatrième partie présente les hypothèses posées dans ce travail de thèse et les valide sur base de résultats issus d'autres études publiées dans la littérature.

Enfin, la cinquième et dernière partie de ce chapitre introductif renseigne sur le contenu et la structure de chacun des sept chapitres de cette thèse.

1 Spécificités de la culture de cellules animales

Sur un siècle, la recherche sur la culture de cellules animales *in vitro* s'est développée de manière frénétique pour aboutir, de nos jours, à des applications industrielles variées représentant un marché d'environ 100 milliards de dollars, soit un sixième du chiffre d'affaire de l'industrie pharmaceutique (Walsh, 2010). Cette section va brièvement décrire comment et grâce à quoi ce marché s'est développé, tout en insistant sur les spécificités de la culture de cellules animales.

D'après Kretzmer (2002), les premières tentatives de culture *in vitro* de cellules animales remontent aux années 1900. Un des événements charnière est le succès de Ross Harrison en 1907 qui parvient, pour la première fois, à cultiver des cellules de nerfs *in vitro* pendant 30 jours, démontrant ainsi que ces cellules conservent leurs fonctions (Harrison, 1907). D'énormes progrès sur les techniques de stérilisation furent nécessaires pour permettre d'autres avancées. Les travaux de Maintland et Maintland (1928) et Enders *et al.* (1949), entre autres, démontrèrent la possibilité de propager un virus à travers des cellules animales afin de les employer pour la production de vaccins. La première application à usage industriel des cellules animales était ainsi née.

Le développement de trois axes de recherches fut nécessaire pour permettre l'élaboration des applications industrielles actuelles. Ces axes de recherches sont :

- L'élaboration d'un milieu de culture adapté aux cellules animales ;
- L'amélioration de leur performance et la diversification de leurs applications par des manipulations génétiques ;
- L'élaboration de bioréacteurs adaptés à leurs caractéristiques.

Les cellules animales requièrent des milieux de culture de composition complexe et pouvant varier d'une lignée cellulaire à l'autre. Marc et Olmos (2010) font une excellente revue sur les avancées technologiques à ce sujet. Les premiers milieux de culture étaient des fluides biologiques qui furent très rapidement remplacés par des milieux dont la formulation est mieux contrôlée et composée uniquement de ce qui est strictement nécessaire aux cellules. Ces milieux sont composés d'un milieu de base et de sérum de veau fœtal. Le milieu de base, commercialisé sous divers noms tels que DMEM, RPMI-1640, HAM'S F12, contient une composition définie de glucides, acides aminés, sels, vitamines, hormones et facteurs de croissance. Le sérum de veau fœtal apporte des protéines nécessaires au développement cellulaire telles que des facteurs de croissance, des hormones et des facteurs d'adhérence. Cependant, ce sérum présente des variabilités d'un lot à l'autre et des risques de contamination par les virus animaux. Dès lors, les autorités régulatrices telles que la « Food and Drug Administration » imposèrent assez rapidement l'utilisation de milieux de culture sans sérum pour les nouvelles applications. Pour pallier l'absence dans le milieu de base des molécules apportées par le sérum, trois stratégies ont été développées successivement dans le temps. Dans les années 80, le milieu de base a tout d'abord été enrichi par des protéines

d'origine animale. Le risque de contamination n'étant pas écarté, cette solution a été remplacée dans les années 90 par des protéines recombinantes produites par la fermentation bactérienne ou présentes dans des hydrolats, tels que ceux de levures. Plus récemment, des milieux sans protéines, mais contenant des hydrolats protéiques, ont été développés pour faciliter les étapes de purification du produit d'intérêt de la culture; ce produit étant généralement une protéine. Des milieux chimiquement définis sont également apparus sur le marché. Ces milieux dont la composition est connue avec précision semblent prometteurs pour la réalisation de recherches fondamentales sur la physiologie cellulaire. Leur utilisation à l'échelle industrielle semble par contre plus difficile en raison de la variabilité des besoins cellulaires d'une lignée à l'autre.

Les avancées les plus spectaculaires ont été réalisées au niveau des manipulations génétiques sur les cellules pour améliorer leurs performances et diversifier leurs applications. Les premières cultures cellulaires étaient réalisées à partir de « cellules primaires » faisant partie initialement d'un même tissu de mammifères et isolées les unes des autres *via* une procédure adéquate. Ces cellules sont, par exemple, des cellules épithéliales recouvrant des organes ou des vaisseaux sanguins, des cellules musculaires ou encore des lymphocytes. L'inconvénient majeur de ces cellules primaires est leur capacité limitée de réplication (50 à 100 fois en moyenne) et le risque majeur de contamination lors de la procédure de séparation des tissus en cellules. Pour pallier cette limitation, des « cellules permanentes » à la capacité de reproduction en théorie infinie ont été élaborées à partir de cellules primaires par transformation génétique *via* une substance mutagène, un virus ou une substance oncogène. A côté des cellules permanentes, un deuxième type de cellules a été mis au point. Il s'agit des « cellules hybrides » obtenues par la fusion de cellules de lymphocytes avec des cellules de myélome, ces dernières étant des cellules cancéreuses de la moelle osseuse. La mise au point des cellules permanentes et des cellules hybrides a permis de diversifier le champ d'application des cultures de cellules animales. De nos jours, les cellules animales sont toujours cultivées pour produire des vaccins tels que le vaccin de la polio, de l'hépatite B, de la rougeole, des oreillons, de la grippe, du papillomavirus, ... Les modifications génétiques des cellules permanentes permettent également la production de certaines glycoprotéines dont la structure est trop complexe que pour être produite par voie chimique ou par voie bactérienne (Jenkins, 2007). Citons les cytokines, les hormones de croissance, les facteurs de coagulation, les enzymes recombinantes... Enfin, les cellules hybrides sécrètent des anticorps monoclonaux. Ces anticorps sont utilisés comme outils de diagnostics pour détecter la présence de maladies et, plus récemment, comme outils thérapeutiques dans les domaines de la transplantation, du cancer, de la sclérose en plaque ... (Eilb *et al.*, 2009 ; Pörtner, 2009).

Les cellules animales ont des caractéristiques propres qui les différencient grandement des bactéries. Leur culture nécessite donc la conception de bioréacteurs adaptés à leurs besoins spécifiques. Premièrement, contrairement aux bactéries, les cellules animales n'ont pas une paroi rigide mais une fine membrane composée de protéines, de lipides et de glucides, ce qui les rend plus sensibles aux contraintes mécaniques générées au sein du bioréacteur. Deuxièmement, leur vitesse de croissance est très faible. Leur temps de doublement est

compris entre 20 et 50 h, ce qui est à comparer à ceux des bactéries compris entre 1 et 2 h. Leur consommation en oxygène est dès lors faible. Le niveau d'aération des bioréacteurs de culture de cellules animales est généralement de l'ordre de 0.05 vvm (volume par volume et par minute), ce qui est 10 à 20 fois plus petit que celui employé en culture bactérienne. Troisièmement, la concentration cellulaire et la concentration en protéines sécrétées restent modérées en fin de culture. Elles sont respectivement de l'ordre de 10^6 cellules mL^{-1} et 5 g L^{-1} . Enfin, toutes les lignées cellulaires primaires et un nombre important de lignées cellulaires permanentes présentent un caractère d'adhérence, c'est-à-dire qu'elles doivent adhérer à la surface d'un solide pour se développer et se reproduire. En l'absence de solide autre que la paroi du bioréacteur, les cellules s'agrègent entre elles ce qui peut poser des problèmes de transfert de matière. Aux échelles pilote et industrielle, les cellules sont généralement fixées sur des billes sphériques d'environ 250 μm composées d'une matrice polymérique de dextran chargée positivement avec une densité de l'ordre de 1030 kg m^{-3} . Ces billes sont commercialisées sous le nom de Cytodex1TM et Cytodex3TM, et sont appelées plus généralement dans la littérature des « microporteurs » (Pörtner, 2009).

Au vu de ces nombreuses dissemblances, il paraît évident que les bioréacteurs pour la culture de bactéries ne sont pas adaptés à la culture de cellules animales et que de nouveaux bioréacteurs doivent donc être conçus et développés. Un bioréacteur adapté à la culture de cellules animales doit permettre un bon transfert de matière. Ceci se traduit par un mélange homogène et par une bonne aération du milieu de culture. Cependant, vu la fragilité des cellules, il faut veiller à ce que l'agitation du milieu de culture n'engendre pas des contraintes mécaniques trop importantes à la surface des membranes cellulaires car cela entraînerait un ralentissement du métabolisme cellulaire voire la lyse de la cellule. Dans le cas de cultures de cellules adhérentes, il faut assurer une surface solide suffisante. Une solution technique largement employée est l'utilisation de microporteurs. Cependant, ces microporteurs doivent être maintenus en suspension complète afin de maximiser la surface disponible pour le développement cellulaire. D'un point de vue technique, il est également important de maintenir la stérilité du milieu de culture, d'avoir un suivi aisé du procédé *via* diverses sondes (pH, O_2 dissous...). Enfin, la rentabilité des procédés de production implique le plus souvent une augmentation de la taille des installations, qui doit être réalisée sans nuire à la productivité.

Divers types de bioréacteurs ont été développés et sont utilisés dans l'industrie pharmaceutique, chacun répondant plus ou moins bien aux critères cités ci-dessus. Eibl et Eibl (2009) catégorisent ces bioréacteurs en cinq groupes sur base du mode de transmission de l'énergie au milieu de culture. Chaque type de bioréacteurs a un domaine d'application bien spécifique. Cette classification est reprise à la Figure I-1 ci-dessous.

La première catégorie de bioréacteurs regroupe les bioréacteurs statiques. Ce sont typiquement les boîtes de Pétri, les T-flasques, les dispositifs multi-plateaux.... Ils sont composés d'un réservoir de quelques mL contenant le milieu de culture auquel aucune énergie mécanique n'est fournie. Ces bioréacteurs permettent d'atteindre des concentrations cellulaires élevées (10^7 cellules mL^{-1}) et sont utilisés lors d'expériences de screening ou de productions pour des essais cliniques.

La seconde catégorie de bioréacteurs regroupe les bioréacteurs mécaniquement agités par un dispositif externe. Ils sont composés d'une poche disposée sur une plateforme vibrante ou rotative qui fournit ainsi de l'énergie mécanique au milieu de culture. Ils sont utilisés pour la production d'agents bioactifs à petite échelle. Ils peuvent aussi être utilisés pour cultiver des cellules qui serviront d'inoculum pour des productions dans des bioréacteurs à plus grande échelle.

La troisième catégorie de bioréacteurs regroupe les bioréacteurs agités mécaniquement par un dispositif interne. Ils sont composés d'une cuve contenant le milieu de culture. Un axe sur lequel sont fixés des mobiles d'agitation tourne sur lui-même grâce à un moteur et fournit ainsi de l'énergie mécanique au milieu de culture. Ces bioréacteurs à cuve agitée sont les plus largement employés par l'industrie pharmaceutique. Ils sont utilisés à l'échelle de quelques centaines de mL pour des expériences de screening jusqu'à des productions industrielles de plusieurs m³.

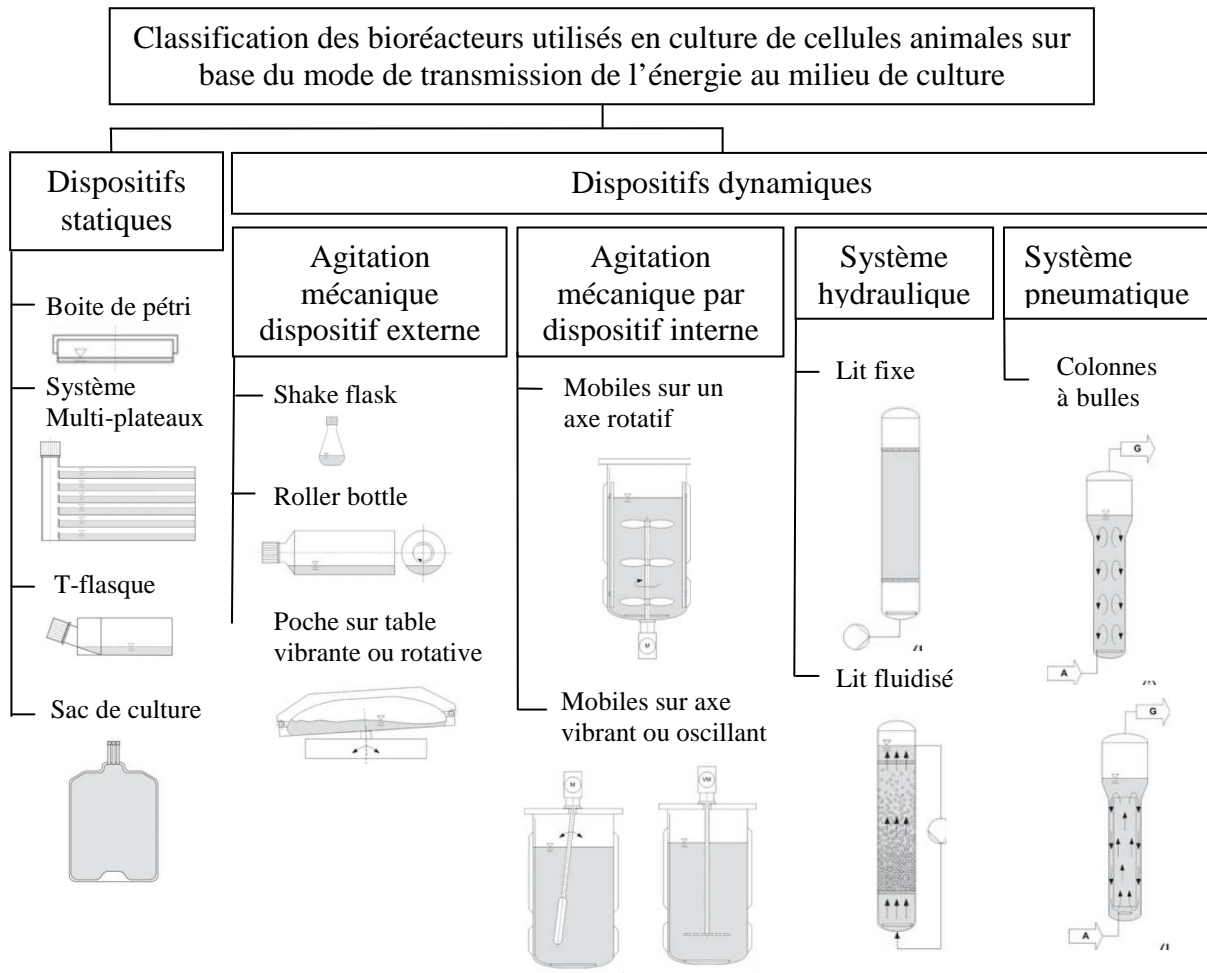


Figure I-1 : Classification des bioréacteurs utilisés en culture de cellules animales sur base du mode de transmission de l'énergie mécanique au milieu de culture (Eibl et Eibl, 2009).

La quatrième catégorie de bioréacteurs regroupe les bioréacteurs où l'énergie mécanique est fournie au milieu de culture par l'intermédiaire d'une pompe de recirculation. Ces bioréacteurs sont composés d'une enceinte contenant le milieu de culture. Le milieu de culture est aspiré par une pompe et rejeté dans l'enceinte créant ainsi une circulation. Deux

types de bioréacteurs appartiennent à cette catégorie : les bioréacteurs à lit fixe et les bioréacteurs à lit fluidisé. Les bioréacteurs à lit fixe sont composés d'un compartiment contenant un matériau macroporeux dans les pores duquel se développent les cellules. Le milieu de culture perfuse de haut en bas à travers ce compartiment grâce à la circulation générée par la pompe. Ce type de bioréacteur présente l'avantage de générer un écoulement peu cisaillant pour les cellules. Néanmoins, il souffre de limitations de transfert de matière et de difficultés à suivre l'évolution du procédé en cours de culture au niveau du compartiment. Il est utilisé jusqu'à une échelle de 100 L pour des applications où le produit d'intérêt est une protéine sécrétée par les cellules. Contrairement aux bioréacteurs à lit fixe, le liquide circule de bas en haut dans les bioréacteurs à lit fluidisé, permettant ainsi de mettre en suspension des microporteurs à la surface desquels les cellules sont fixées. Ces bioréacteurs permettent d'atteindre une concentration cellulaire importante. Ils sont utilisés dans des applications variées (vaccins, anticorps, protéines recombinantes) de l'échelle du laboratoire jusqu'à une échelle de l'ordre de 100 L.

La cinquième et dernière catégorie regroupe les bioréacteurs où l'énergie mécanique est fournie au milieu de culture par la détente d'un gaz. Il s'agit principalement de bioréacteurs à colonne à bulles composés d'une colonne cylindrique pouvant atteindre plusieurs m de haut et contenant le milieu de culture. Des bulles d'air sont distribuées au pied de la colonne et montent le long de celle-ci tout en grossissant. Ces bioréacteurs pourraient être utilisés à l'échelle industrielle car ils présentent l'avantage d'un faible coût vu leur design simple, sans pièce mécanique mobile. Cependant, la rupture des bulles à la surface du liquide génère des contraintes de cisaillement très élevées qui pourraient endommager les cellules. Ce problème explique leur faible utilisation actuelle dans l'industrie pharmaceutique.

En synthèse, cette section introductive a souligné les spécificités de la culture de cellules animales. Elle a montré que la culture de cellules animales correspond à un marché en explosion aux applications diversifiées (vaccins, protéines recombinantes, anticorps monoclonaux). Cette diversification a été possible grâce à une recherche intense sur les cellules et leur milieu de culture. Elle a également mis en évidence que les cellules animales présentent des caractéristiques très distinctes des bactéries et nécessitent donc des bioréacteurs spécifiques.

2 Définition du problème

Dans la section précédente, il a été clairement mis en évidence que la culture de cellules animales nécessite le développement de bioréacteurs adaptés aux besoins cellulaires. Une variété de bioréacteurs existe mais les plus employés dans l'industrie pharmaceutique sont les bioréacteurs à cuve agitée. Dans cette section, nous allons montrer, à travers diverses études, à quel point les performances d'une culture de cellules animales en cuve agitée dépendent des conditions physico-chimiques et hydrodynamiques locales au sein du bioréacteur. Nous allons également montrer que ces conditions sont fonction du design du bioréacteur et de son mode opératoire. Cet ensemble nous permettra de poser le problème central de cette thèse : la définition du design et des conditions opératoires d'un bioréacteur à cuve agitée au sein duquel l'écoulement généré est caractérisé par un bon transfert de matière et de faibles

contraintes mécaniques. Nous verrons que les conditions opératoires permettant d'optimiser ces deux caractéristiques ne sont pas nécessairement similaires et qu'un compromis doit donc être trouvé. Ce problème est d'autant plus critique dans le cas de la culture de cellules animales adhérentes sur microporteurs car, d'une part, l'énergie mécanique à fournir au milieu pour obtenir une homogénéité suffisante est plus importante en raison de la nécessité de maintenir les microporteurs en suspension complète et, d'autre part, les cellules adhérentes sont réputées plus sensibles vis-à-vis des contraintes mécaniques que leurs homologues non adhérentes. Dès lors, cette thèse se concentrera exclusivement sur le cas spécifique de la culture de cellules adhérentes sur microporteurs en cuve agitée vu la complexité du problème et sa fréquente occurrence dans de nombreuses applications pharmaceutiques.

2.1 Description de la structure de l'écoulement turbulent au sein d'une cuve agitée

Avant d'être en mesure d'interpréter les résultats des études montrant le lien entre les performances des cultures de cellules animales et les conditions physico-chimiques et hydrodynamiques, il est nécessaire de décrire la structure de l'écoulement dans une cuve agitée.

Un bioréacteur à cuve agitée (Figure I-2) est généralement constitué d'une cuve cylindrique avec un fond plat, un fond bombé ou un fond hémisphérique. Un axe vertical sur lequel sont fixés un ou plusieurs mobiles tournant sur eux-mêmes grâce à l'entraînement d'un moteur est disposé au centre de la cuve. Les parois de la cuve sont garnies de deux à quatre chicanes verticales, aussi appelées contre-pales. Grâce à sa rotation, le ou les mobiles exercent une action de pompage sur le milieu.

Aux vitesses de rotation utilisées en culture cellulaire, l'écoulement de la phase liquide est dit turbulent. Il s'agit en fait d'un type d'écoulement où les forces inertielles prédominent par rapport aux forces visqueuses. Ces deux termes interviennent dans les équations de Navier-Stokes qui régissent les écoulements de tout liquide. Dans un écoulement turbulent, vu la prépondérance des forces inertielles, la moindre petite perturbation est amplifiée en une myriade de perturbations. Le nombre de Reynolds est un nombre adimensionnel qui quantifie la prépondérance des forces inertielles par rapport aux forces visqueuses. Il s'exprime par :

$$\text{Re} = \frac{|\nabla \vec{u} \cdot \vec{u}|}{|\nu \Delta \vec{u}|} \propto \frac{U^2 / L}{\nu U / L^2} = \frac{U L}{\nu} \quad (\text{I-1})$$

Dimensionnellement, il peut donc être estimé par le rapport entre le produit d'une vitesse caractéristique U et d'une longueur caractéristique de l'écoulement L , d'une part, et la viscosité cinématique ν du fluide, d'autre part. Dans une cuve agitée, la vitesse caractéristique choisie est la vitesse en bout de pale, proportionnelle au produit $N d$, où N est la vitesse de rotation en s^{-1} et d est le diamètre du mobile en m. La longueur caractéristique est quant à elle égale au diamètre du mobile. Le nombre de Reynolds pour une cuve agitée est donc donné par l'expression :

$$Re = \frac{N d}{\nu} \quad (I-2)$$

L'écoulement dans une cuve agitée est considéré comme turbulent lorsque le rapport entre les forces inertielles et les forces visqueuses, égal au nombre de Reynolds, est supérieur à 1000.

Dans un écoulement turbulent, la vitesse du fluide peut être décomposée en deux composantes qui se superposent : une composante moyennée sur le temps et une composante fluctuante.

L'écoulement moyen, obtenu en moyennant sur le temps la vitesse instantanée des particules de fluide, se compose de boucles de recirculation qui sont générées par le (ou les) mobile(s) et qui y reviennent. La forme des boucles dépend de la géométrie des mobiles. Ces derniers peuvent être classés en deux catégories suivant que le fluide est éjecté des pales du mobile dans la direction axiale (Figure I-2a) ou la direction radiale (Figure I-2b). Les contre-pales disposées le long de la paroi empêchent le fluide de tourner d'un seul bloc et favorisent ainsi le mouvement du fluide dans les directions axiale et radiale. Pour la culture de cellules animales sur microporteurs, les mobiles axiaux sont préférés aux mobiles radiaux car ils génèrent un pompage du fluide de bas en haut favorisant la mise en suspension des microporteurs.

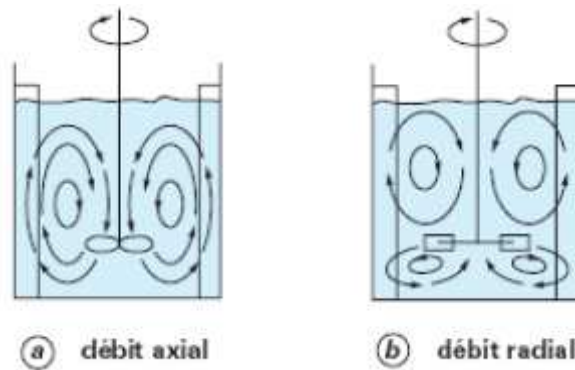


Figure I-2 : Design typique d'une cuve agitée. Structure de l'écoulement moyen généré (a) par un mobile axial (b) par un mobile radial.

La composante fluctuante de l'écoulement est plus complexe à décrire. En effet, il n'existe pas encore de théorie universelle permettant de décrire les écoulements turbulents. De nombreuses recherches sont toujours en cours. Elles ont donné lieu à divers modèles permettant de décrire plus ou moins fidèlement un certain nombre d'écoulements turbulents. Un modèle assez largement accepté dans la littérature pour décrire l'écoulement turbulent dans une cuve agitée est celui proposé par Richardson et Kolmogorov (Pope, 2000). Ce modèle représente l'écoulement turbulent comme la superposition d'une cascade de tourbillons de tailles décroissantes. Ces tourbillons transfèrent, à un taux constant ε , l'énergie fournie aux grandes structures par le mobile vers les petites structures où elle est finalement dissipée en chaleur par les forces visqueuses (Figure I-3). Comme montré sur la Figure I-3, ces tourbillons se superposent dans l'espace. La structure des grands tourbillons dépend de la géométrie de la cuve. Il est généralement admis que leur taille est du même ordre de grandeur que le dixième du diamètre du mobile d'agitation (Khan, 2005 ; Kresta et Wood, 1993 ; Sheng *et al.*, 2000 ; Zhou et Kresta, 1996). Au fur et à mesure que leur taille décroît, la structure des tourbillons devient indépendante de la géométrie de la cuve. Elle acquiert des

caractéristiques universelles qui dépendent uniquement du taux d'énergie transférée, ε , et de la taille des tourbillons. Ces caractéristiques sont également indépendantes de la viscosité du fluide. Les tourbillons répondant à ces caractéristiques appartiennent au régime inertiel car l'ensemble de leur énergie est transférée sans dissipation aux sous-structures qu'ils engendrent. La taille des plus petits tourbillons présents au sein de l'écoulement correspond à l'échelle où les forces visqueuses sont égales aux forces inertielles et où l'énergie commence à être progressivement dissipée sous forme de chaleur par frottement. Cette taille de tourbillon est appelée l'échelle de Kolmogorov λ_K . Elle est obtenue par la relation dimensionnelle :

$$\lambda_K = \left(\frac{\nu^3}{\varepsilon} \right)^{1/4} \quad (I-3)$$

qui ne dépend donc que du taux d'énergie transférée d'une échelle à l'autre, ε , et de la viscosité cinématique du fluide, ν .

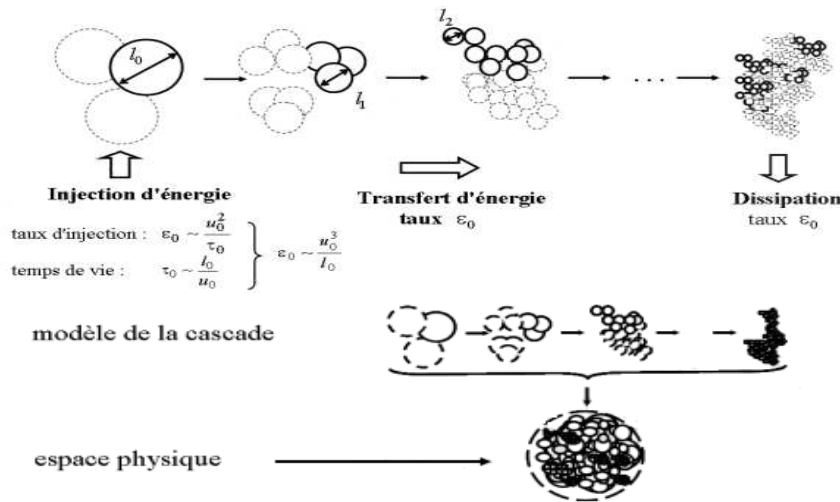


Figure I-3 : Représentation physique du modèle de la cascade d'énergie de Richardson et Kolmogorov.
Illustration issue de Jacquin et Tabelin (2004).

Grâce au développement de différentes techniques de visualisation de champs de vitesse telles que la vélocimétrie par image de particules (P.I.V.) ou l'anémométrie à laser doppler (L.D.A), plusieurs équipes de recherche ont mené des travaux visant à caractériser expérimentalement la structure moyenne et fluctuante des écoulements turbulents dans des cuves agitées. Ces travaux sont nombreux. Les équipes des professeurs Yianneskis (Baldi et Yianneskis, 2004 ; Ducci et Yianneskis, 2006 ; Micheletti *et al.*, 2004 ; Ng et Yianneskis, 2000...), Liné (Escudié *et al.*, 2004 ; Escudié et Liné, 2003 ; Escudié et Liné, 2006 ; Huchet *et al.*, 2009) et Kresta (Kresta, 1998 ; Zhou et Kresta, 1996 ; Zhou et Kresta, 1998) furent particulièrement actives dans la caractérisation de l'écoulement turbulent généré par une turbine de Rushton. Dans la suite de cette revue succincte, seules les études mettant en œuvre une cuve agitée par un mobile axial seront citées puisque ce type de mobile est préféré pour la culture de cellules adhérentes sur microporteurs. Dans la grande majorité des publications sur le sujet, les résultats sont présentés en deux parties.

La première partie décrit la structure de l'écoulement moyen. Les travaux de Bittorf et Kresta (2000), Jaworski *et al.* (2001) et Kumaresan et Joshi (2006) montrent clairement que

l'intensité du champ moyen de vitesse, l'étendue et la forme des boucles de recirculation dépendent du design du mobile d'agitation, de sa position dans la cuve et du design de la cuve. Des grandeurs quantitatives utiles pour la montée en échelle du procédé sont également extraites de cette première phase d'analyse. Ces grandeurs sont, par exemple, le débit de pompage et le débit de recirculation, respectivement définis comme la quantité de fluide qui passe à travers le mobile ou à travers une section déterminée de la cuve par unité de temps (Xuereb *et al.*, 2006).

La seconde partie des résultats présentés dans ces études caractérise la composante fluctuante de l'écoulement turbulent. Pour isoler cette composante, une décomposition de Reynolds est nécessaire. Cette décomposition consiste à soustraire de chaque champ instantané de vitesse acquis au temps t donné, le champ moyen de vitesse obtenu en moyennant l'ensemble des champs instantanés. Mathématiquement, cette opération s'exprime par :

$$u'(x, y, z, t) = u(x, y, z, t) - \bar{u}(x, y, z) \quad (I-4)$$

où u est la valeur instantanée de la vitesse au temps t et au point de coordonnées (x, y, z) , \bar{u} est la valeur moyenne de la vitesse au cours du temps au point de coordonnées (x, y, z) et u' est la valeur de la fluctuation de la vitesse au temps t et au point de coordonnées (x, y, z) .

Étant donné la relation entre ces trois grandeurs, la moyenne temporelle de la fluctuation de la vitesse u' est nulle.

$$\overline{u'}(x, y, z) = \overline{u}(x, y, z) - \overline{\overline{u}}(x, y, z) = \overline{u}(x, y, z) - \overline{u}(x, y, z) = 0 \quad (I-5)$$

La caractérisation de la distribution moyenne de la composante fluctuante de l'écoulement au sein de la cuve nécessite donc le calcul d'une moyenne quadratique :

$$u'_{RMS} = \sqrt{\overline{(u')^2}} \quad (I-6)$$

Cette moyenne quadratique est l'élément de base pour le calcul de diverses grandeurs qui caractérisent l'écoulement turbulent.

Ces grandeurs sont :

- L'énergie cinétique turbulente k . Il s'agit de l'énergie cinétique associée uniquement à la composante fluctuante de l'écoulement ;

$$k = \frac{1}{2} (\overline{u'^2_x} + \overline{u'^2_y} + \overline{u'^2_z}) \quad (I-7)$$

- Le taux de dissipation de l'énergie cinétique turbulente ε . Il s'agit du taux d'énergie cinétique turbulente transférée d'une échelle de tourbillons à l'autre et qui est finalement dissipée en chaleur à l'échelle de Kolmogorov ;

$$\varepsilon = \nu \left\{ \begin{aligned} &2 \left(\overline{\left(\frac{\partial u'_x}{\partial x} \right)^2} + \overline{\left(\frac{\partial u'_y}{\partial x} \right)^2} + \overline{\left(\frac{\partial u'_z}{\partial x} \right)^2} + \overline{\left(\frac{\partial u'_x}{\partial y} \right)^2} + 2 \left(\overline{\left(\frac{\partial u'_y}{\partial y} \right)^2} + \overline{\left(\frac{\partial u'_z}{\partial y} \right)^2} + \overline{\left(\frac{\partial u'_x}{\partial z} \right)^2} \right) \\ &+ \overline{\left(\frac{\partial u'_y}{\partial z} \right)^2} + 2 \left(\overline{\left(\frac{\partial u'_z}{\partial z} \right)^2} + 2 \left(\overline{\left(\frac{\partial u'_x}{\partial y} \right) \left(\frac{\partial u'_y}{\partial x} \right)} + \overline{\left(\frac{\partial u'_x}{\partial z} \right) \left(\frac{\partial u'_z}{\partial x} \right)} + \overline{\left(\frac{\partial u'_y}{\partial z} \right) \left(\frac{\partial u'_z}{\partial y} \right)} \right) \right\} \quad (I-8) \end{aligned} \right.$$

- La contrainte de cisaillement turbulente τ_{ij} . Elle correspond aux forces de cisaillement dues à la différence de vitesse entre des particules de fluides voisines. Elle est obtenue à partir du tenseur de Reynolds.

$$\tau_{ij} = -\rho_l \overline{u_i' u_j'} \quad (I-9)$$

où i et j prennent successivement les valeurs x , y et z et où ρ_l correspond à la densité du fluide.

L'estimation de ces grandeurs est importante. En effet, ces grandeurs gouvernent de nombreux phénomènes tels que, par exemple, le mélange de fluides miscibles ou non miscibles, la rupture des bulles de gaz, les contraintes de cisaillement appliquées à la surface d'une phase solide... Il est donc important de pouvoir les quantifier pour être à même de prédire leur impact lors du dimensionnement de cuves agitées. Les études réalisées, entre autres, par Bugay *et al.* (2002), Gabriele *et al.* (2009), Khan *et al.* (2006), Kilander et Rasmuson (2005), Kumaresan et Joshi (2006), Zhu *et al.* (2009), montrent que les trois grandeurs citées ci-dessus ne sont pas réparties de manière uniforme dans la cuve (Figure I-4). Elles sont généralement nettement plus élevées dans la zone balayée par le mobile et dans le jet à la sortie des pales. Elles sont nettement plus faibles dans le reste de l'écoulement. Pour donner une idée de cette non-uniformité, divers résultats peuvent être cités. Par exemple, Zhou et Kresta (1996) annoncent un *ratio* d'environ 30 entre le taux de dissipation maximale de l'énergie cinétique turbulente ε_{\max} et le taux moyen $\varepsilon_{\text{moyen}}$ pour une turbine à quatre pales inclinées à 45°. Khan *et al.* (2006) mentionnent un *ratio* de 40. Ils annoncent également que 44% de la puissance fournie au fluide par le mobile est dissipée dans la région balayée par ce dernier. Diverses études montrent également que la répartition spatiale des trois grandeurs k , ε , τ_{ij} est fonction de la géométrie du mobile, de sa position dans la cuve et du design de la cuve. Ces études mettent également en exergue la difficulté d'estimer de manière fiable le taux de dissipation de l'énergie turbulente ε . En effet, cette dissipation se produit à l'échelle de Kolmogorov qui est de l'ordre de quelques dizaines voire une centaine de μm et sa détermination expérimentale implique la réalisation de mesures de champs instantanés de vitesse à cette même échelle. De nombreuses recherches sont toujours en cours sur ce sujet. Toutes ces études mettent cependant en évidence une propriété caractéristique de l'écoulement turbulent : lorsque les grandeurs \overline{u} , $\sqrt{u'^2}$, k , ε , τ_{ij} sont rendues adimensionnelles, leur répartition spatiale est indépendante de la vitesse de rotation du mobile. La vérification de cette propriété permet d'ailleurs de confirmer que l'écoulement dans la cuve agitée est effectivement turbulent.

Les paragraphes précédents ont donc rappelé que l'écoulement dans une cuve agitée peut être décrit comme résultant de la superposition d'une composante moyenne constituée de boucles de recirculation et d'une composante turbulente constituée d'une cascade de tourbillons qui échangent de l'énergie. Cette composante turbulente peut être caractérisée par trois grandeurs, l'énergie cinétique turbulente k , le taux de dissipation de l'énergie cinétique turbulente ε et la contrainte de cisaillement turbulent τ_{ij} , qui ne sont pas réparties de manière uniforme dans la cuve. Elles sont nettement plus élevées dans la zone proche du mobile et nettement plus faibles dans le reste de l'écoulement. La structure de l'écoulement moyen et la

répartition des trois grandeurs caractéristiques de la composante turbulente sont fonction du design de la cuve et du mobile d'agitation.

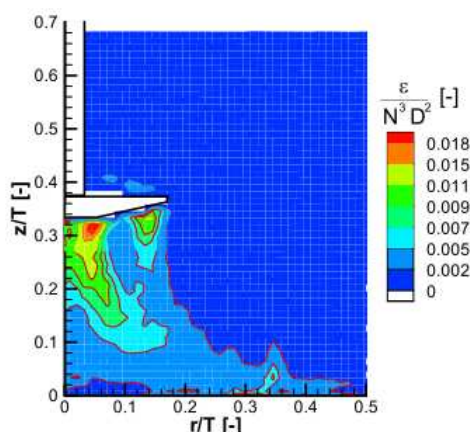


Figure I-4 : Non uniformité de la répartition spatiale des grandeurs turbulentes telles que le taux de dissipation de l'énergie cinétique turbulente ε (Baldi et Yianneskis, 2004).

2.2 Mécanisme d'interaction entre l'écoulement turbulent et les cellules animales fixées sur les microporteurs

Cette description de la structure de l'écoulement dans une cuve agitée permet de mieux comprendre les liens qui existent entre les performances des procédés de cultures de cellules animales et l'environnement physico-chimique et hydrodynamique généré par le mobile d'agitation. Les études menées par Cherry et Papoutsakis (1986, 1988, 1989), Croughan *et al.* (1988, 1989, 2006), Lakhotia et Papoutsakis (1992), Papoutsakis (1991), Wu (1999) montrent que les cellules animales adhérentes cultivées sur microporteurs en cuve agitée semblent sensibles aux contraintes mécaniques générées par l'écoulement turbulent de la phase liquide et ce à partir d'un certain niveau d'agitation. En effet, ces auteurs observent une diminution de la vitesse spécifique de croissance cellulaire ou une augmentation de la vitesse spécifique de mort avec l'augmentation de la vitesse de rotation du mobile. Un exemple typique de résultats obtenus lors de ces études est illustré à la Figure I-5. Ce graphique montre l'évolution de la concentration cellulaire au cours du temps en fonction de la vitesse de rotation du mobile. Ce graphique montre clairement que la croissance des cellules Véro cultivées sur microporteurs dans un bioréacteur de 250 mL ralentit fortement lorsque la vitesse de rotation de la turbine à deux pales droites excède 60 rotations par minute (rpm) (Hirtenstein et Clark, 1981).

Des études plus récentes montrent que la réponse cellulaire à un stress hydrodynamique ne se limite pas à une diminution de la vitesse de croissance ou à une augmentation de la mort par lyse. Comme présenté par Weug *et al.* (2011), le stress hydrodynamique peut également interagir sur la machinerie cellulaire en réduisant par exemple l'expression de gènes pluripotents de cellules souches d'embryons humains.

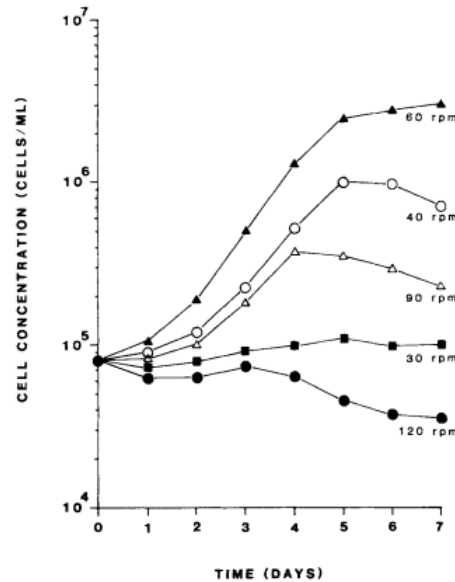


Figure I-5 : L'évolution temporelle de la concentration en cellules Vero cultivées sur microporteurs (3 g L^{-1}) dans un bioréacteur de 250 mL dépend de la vitesse de rotation du mobile. (Hirtenstein et Clark, 1981).

Au vu de ces divers résultats, les chercheurs ont tenté de comprendre les mécanismes selon lesquels l'écoulement turbulent interagit avec les cellules fixées à la surface des microporteurs, générant ainsi un stress hydrodynamique. Cherry et Papoutsakis (1986) établissent ainsi une liste des phénomènes hydrodynamiques pouvant générer des contraintes mécaniques à la surface des cellules :

- Les microporteurs étant légèrement plus denses que le milieu de culture, leur décantation peut induire une vitesse relative entre les microporteurs et le fluide environnant, générant une contrainte de cisaillement à la surface des cellules. Cependant, si la contrainte de cisaillement est estimée en calculant la vitesse de chute d'un microporteur dans un fluide stagnant, une valeur d'environ 0.07 N m^{-2} est obtenue. Cette valeur est largement inférieure à la valeur seuil estimée aux alentours de 1 N m^{-2} (Stathopoulos et Hellums, 1985). Dès lors, le stress hydrodynamique généré par la différence de vitesse entre les microporteurs et le fluide environnant peut être considérée comme négligeable. C'est encore plus vrai lorsque les microporteurs sont placés dans la cuve agitée, où, vu leur petite taille et la faible différence de densité, ils suivent l'écoulement du fluide qui n'est pas stagnant mais en écoulement turbulent.
- Comme présenté au paragraphe précédent, l'écoulement turbulent est constitué de la superposition d'une cascade de tourbillons de tailles décroissantes jusqu'à l'échelle de Kolmogorov. Ces tourbillons peuvent interagir avec les microporteurs en générant des contraintes de cisaillement à la surface des cellules fixées sur ces derniers. Cependant, seuls les tourbillons ayant une taille similaire ou inférieure à celle des microporteurs sont en mesure de générer ce cisaillement, car les tourbillons nettement plus grands que les microporteurs génèrent un écoulement convectif local au sein duquel les microporteurs sont entraînés (Figure I-6). Le caractère néfaste des contraintes de cisaillement générées par les tourbillons ayant une taille similaire ou inférieure à celle des microporteurs est encore accentué par le fait que les cellules sont fixées sur les billes de microporteurs et ne peuvent pas tourner sur elles-mêmes pour réduire la contrainte subie (Figure I-6). Divers

auteurs (Cherry et Papoutsakis 1988, Croughan *et al.*, 1987) ont montré que cette source de stress hydrodynamique a un impact sur les performances des cultures cellulaires. Ils observent que la vitesse spécifique de croissance cellulaire diminue brusquement et que la vitesse spécifique de mort croît brutalement lorsque l'échelle moyenne de Kolmogorov est inférieure à la moitié de la taille des microporteurs et ce de manière plus ou moins indépendante de la taille du bioréacteur (Figure I-7). L'estimation de l'échelle de Kolmogorov et sa comparaison avec la taille des microporteurs est donc un bon moyen pour prédire la présence de ce stress hydrodynamique. Pour rappel, la taille de l'échelle de Kolmogorov peut être calculée par la Relation I-3 lorsque le taux d'énergie dissipée ε et la viscosité cinématique du fluide ν sont connus.

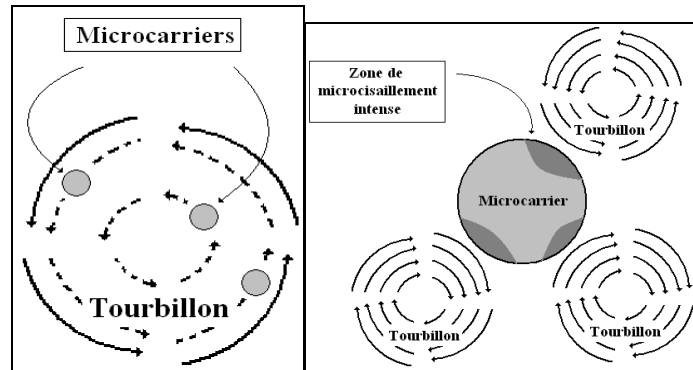


Figure I-6 : Nature des interactions entre les microporteurs et les tourbillons en fonction de leurs tailles relatives.

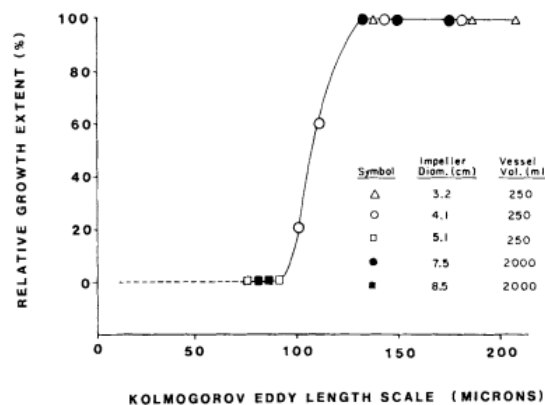


Figure I-7 : Diminution brutale de la vitesse spécifique de croissance des cellules lorsque la taille de l'échelle de Kolmogorov est inférieure à la moitié de la taille des microporteurs (Croughan *et al.*, 1987).

- Une troisième source de contraintes mécaniques provient des collisions intervenant entre microporteurs. Ces collisions sont favorisées par les divers tourbillons présents au sein de l'écoulement car ces tourbillons favorisent l'apparition de vitesses relatives importantes entre microporteurs voisins. Cherry et Papoutsakis (1989) proposent deux mécanismes. Dans le premier mécanisme proposé, Cherry et Papoutsakis (1989) suggèrent que les vitesses relatives les plus significatives entre microporteurs voisins sont générées par des tourbillons dont la taille est égale à la distance moyenne entre les faces externes des microporteurs voisins. En effet, ce type de tourbillons est en mesure d'accélérer un microporteur sans interagir avec l'autre, générant ainsi une vitesse relative. Selon la concentration en microporteurs, cette taille est approximativement égale ou légèrement

inférieure à celle des microporteurs, moyennant l'hypothèse que les microporteurs sont répartis de manière uniforme dans la cuve et peuvent être considérés comme placés sur les sommets de tétraèdres réguliers.

Cherry et Papoutsakis (1989) proposent un second mécanisme lorsque l'agitation n'est pas suffisamment vigoureuse pour générer des tourbillons d'aussi petites tailles. Dans ce cas, des vitesses relatives entre microporteurs voisins apparaissent selon le mécanisme suivant. L'écoulement local dans un tourbillon est de type cisaillé. Chaque microporteur se déplace sur une ligne de flux à une vitesse constante. La différence de vitesse entre deux lignes de flux séparées d'une distance l est égale à γl , où γ est le gradient local de vitesse. Deux microporteurs entrent en collision s'ils se déplacent sur deux lignes de flux séparées d'une distance inférieure au diamètre du microporteur d_p .

Pour quantifier l'effet de ces collisions et évaluer leur impact sur les performances des cultures de cellules animales sur microporteurs, Cherry et Papoutsakis (1989) définissent une grandeur appelée « Turbulent Collision Severity : TCS » qui correspond à l'énergie cinétique de collision par bille et par unité de temps. Pour la calculer, il faut donc multiplier l'énergie cinétique d'une collision par la fréquence de collisions et rapporter le résultat au nombre total de billes. L'énergie cinétique de collisions est estimée par :

$$\frac{m v_{br}^2}{2} \quad (I-10)$$

où m est la masse d'un microporteur et v_{br} est la moyenne quadratique de la vitesse relative entre microporteurs voisins. La fréquence de collisions est estimée à partir des travaux de Hinze (1971) par :

$$\frac{v_{br} \alpha^2}{d_p^4} \quad (I-11)$$

où α est la fraction volumique en microporteurs et d_p est le diamètre des microporteurs.

L'expression de TCS devient donc :

$$TCS = \left(\frac{m v_{br}^2}{2} \right) \left(\frac{v_{br} \alpha^2}{d_p^4} \right) / \left(\frac{\alpha}{(\pi/6) d_p^3} \right) = v_{br}^3 \left(\frac{\pi^2 \rho_p d_p^2 \alpha}{72} \right) \quad (I-12)$$

où ρ_p est la densité des microporteurs.

L'expression de la vitesse relative entre microporteurs dépend du modèle adopté. Si on considère le premier mécanisme proposé, la taille des tourbillons qui favorise les collisions est égale à l'échelle de Kolmogorov. La vitesse de ces tourbillons peut donc être choisie pour estimer v_{br} . L'expression de TCS devient donc :

$$TCS_{eddies} = v_{br}^3 \left(\frac{\pi^2 \rho_p d_p^2 \alpha}{72} \right) = (\varepsilon \nu)^{3/4} \left(\frac{\pi^2 \rho_p d_p^2 \alpha}{72} \right) \quad (I-13)$$

où ε est le taux d'énergie transférée d'une échelle de tourbillons à l'autre et dissipée en chaleur et ν est la viscosité cinématique du fluide.

Si on considère le second mécanisme proposé, v_{br} est estimée par le produit du gradient de vitesse au sein du tourbillon γ et du diamètre des microporteurs d_p . Le gradient de

vitesse le plus important étant celui généré par les plus petits tourbillons présents au sein de l'écoulement (*i.e.* l'échelle de Kolmogorov), TCS devient :

$$TCS_{shear} = v_{br}^3 \left(\frac{\pi^2 \rho_p d_p^2 \alpha}{72} \right) = \left[\left(\frac{\varepsilon}{\nu} \right)^{1/2} d_p \right]^3 \left(\frac{\pi^2 \rho_p d_p^2 \alpha}{72} \right) \quad (I-14)$$

Cherry et Papoutsakis (1989) ont montré que les contraintes mécaniques générées par les collisions ont un impact significatif sur les performances cellulaires. En effet, comme illustré à la Figure I-8, la vitesse spécifique de mort q de cellules de rein d'embryon bovin croît lorsque la valeur du TCS augmente.

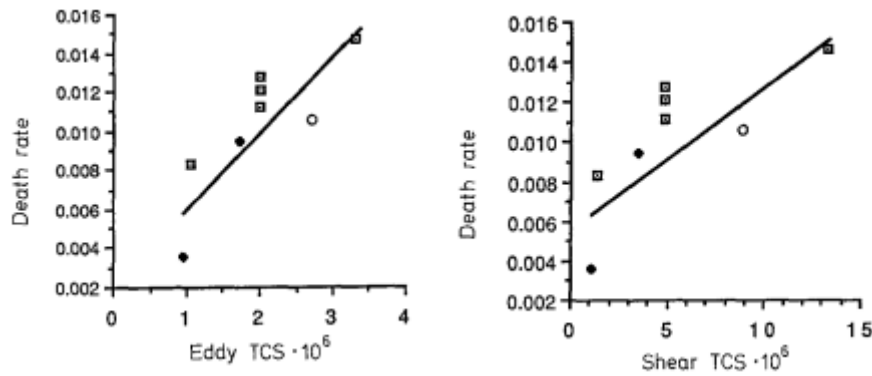


Figure I-8 : Augmentation de la vitesse spécifique de décès des cellules avec la valeur du TCS_{eddy} ou TCS_{shear} exprimée en $10^{-6} \text{ g cm}^2 \text{ s}^{-3}$ ($10^{-13} \text{ J s}^{-1}$) (Cherry et Papoutsakis, 1989).

- Une quatrième source de stress hydrodynamique est citée par Cherry et Papoutsakis (1987). Il s'agit du stress hydrodynamique provenant de l'interaction des microporteurs avec les pales du mobile d'agitation. Cette interaction prend deux formes : collisions et cisaillement dans la couche limite entourant le mobile. Cependant, les auteurs écartent ces deux mécanismes en montrant que les collisions entre les microporteurs et les pales du mobiles restent des phénomènes « rares » par rapport aux collisions entre microporteurs et en démontrant que les contraintes de cisaillement dans la couche limite sont d'une part limitées à une zone très petite et d'autre part ne sont pas assez intenses que pour produire des dommages cellulaires.

Au vu de cette discussion, deux mécanismes semblent générer un stress hydrodynamique impactant les performances de la culture de cellules animales sur microporteurs. Il s'agit des contraintes de cisaillement générées par de petits tourbillons à la surface des cellules et des contraintes mécaniques résultant de l'impact entre deux ou plusieurs microporteurs. Différents auteurs (Croughan *et al.*, 1988 ; Croughan *et al.*, 1989 ; Wu, 1999) ont tenté d'évaluer l'importance relative de ces deux mécanismes en faisant varier la concentration en microporteurs et la viscosité du milieu de culture. En effet, on peut s'attendre à ce que la proportion de mort cellulaire due aux contraintes de cisaillement diminue lorsque la viscosité du milieu de culture augmente puisque, d'après la Relation I-3, la taille de l'échelle de Kolmogorov augmente. De même, on peut s'attendre à ce que la proportion de mort cellulaire due aux collisions croisse lorsque la concentration en microporteurs augmente. Les auteurs

observent des résultats allant dans ce sens. Cependant, il est difficile d'associer une prépondérance à une des deux sources de stress hydrodynamique car elles dépendent du même phénomène : l'interaction entre les microporteurs et les tourbillons de tailles similaires à ces derniers. Ces interactions sont fonction de la même grandeur : le taux de dissipation de l'énergie cinétique turbulente ε .

Il est important de souligner que les mécanismes décrits ci-dessus n'ont un impact significatif que dans le cas de cultures de cellules animales adhérentes sur microporteurs dans une cuve agitée. En effet, la taille des cellules libres cultivées en cuve agitée ($\approx 20 \mu\text{m}$) étant largement inférieure à l'échelle de Kolmogorov, elles ne sont pas sensibles aux deux sources de stress hydrodynamique citées ci-dessus.

Une autre source de contraintes mécaniques pouvant affecter aussi bien les cellules libres cultivées en suspension que les cellules adhérentes cultivées sur microporteurs est la coalescence et la rupture des bulles d'air dans le milieu de culture et à la surface libre du bioréacteur (Chisti, 2000). Cependant, le taux d'aération utilisé dans les bioréacteurs étant généralement très faible (0.05 vvm), l'ajout de molécules de surfactants telles que le Pluronic F68 permet de réduire significativement les contraintes mécaniques générées par la rupture des bulles. Le stress hydrodynamique associé à l'aération du bioréacteur ne sera donc pas considéré dans la suite de cette thèse.

Il apparaît donc que les cellules animales adhérentes cultivées sur microporteurs en cuve agitée sont sensibles aux contraintes mécaniques générées par l'écoulement turbulent de la phase liquide. Divers modèles peuvent être utilisés pour évaluer quantitativement ces contraintes mécaniques sur base du taux de dissipation de l'énergie cinétique turbulente ε et d'autres caractéristiques physiques du milieu de culture, comme la viscosité et la densité du fluide, la charge en microporteurs, leurs dimensions...

La quantification des contraintes mécaniques générées par l'écoulement en fonction du design du bioréacteur et des conditions opératoires nécessite donc de connaître la relation existant entre le taux de dissipation de l'énergie cinétique turbulente ε et les conditions opératoires, pour un design donné de bioréacteur.

Comment établir cette relation ?

L'énergie qui est *in fine* dissipée sous forme de chaleur à l'échelle de Kolmogorov est initialement fournie au fluide par le mobile d'agitation. La puissance globale P fournie à l'ensemble du bioréacteur peut être mesurée au niveau du moteur par la détermination du couple appliqué sur l'axe d'agitation. Connaissant la puissance globale fournie au bioréacteur, il est possible d'estimer un taux moyen de dissipation de l'énergie cinétique turbulente ε_{moyen} :

$$\varepsilon_{moyen} = \frac{P}{\rho_l V} \quad (I-15)$$

V est le volume du bioréacteur et ρ_l est la densité de la phase liquide. Le terme « moyen » doit être compris ici comme une moyenne volumétrique et non une moyenne temporelle en un point. La valeur moyenne obtenue n'est qu'une première estimation de ε car le taux de dissipation de l'énergie cinétique turbulente n'est pas réparti de manière homogène dans la cuve. En régime turbulent, la puissance globale P fournie au bioréacteur est reliée aux conditions opératoires du bioréacteur par l'expression (Xuereb *et al.*, 2006) :

$$P = \rho_l N_p N^3 d^5 \quad (I-16)$$

La puissance globale est donc fonction de la vitesse de rotation du mobile N (exprimée en tour s^{-1}) et du design du mobile à travers son diamètre d (exprimé en m) et son nombre de puissance N_p . Ce dernier est une constante adimensionnelle caractéristique d'un type de mobile.

Pour un mobile donné, la puissance globale P , le taux de dissipation moyen ε_{moyen} , le taux de dissipation de l'énergie cinétique turbulente ε et le stress hydrodynamique seront donc d'autant plus importants que la vitesse de rotation sera élevée. Ce constat pourrait conduire à la conclusion un peu hâtive qu'il ne faut pas agiter un bioréacteur si on veut minimiser les contraintes mécaniques appliquées sur les cellules par l'écoulement de la phase liquide. Mais ce raisonnement ne tient pas compte du fait qu'un bioréacteur adapté à la culture de cellules animales doit également permettre de répondre aux deux contraintes suivantes :

- Premièrement, il doit assurer un bon transfert des nutriments vers chaque cellule et permettre l'élimination des déchets. Ce transfert de matière est maximisé par l'homogénéisation du milieu de culture, une dispersion efficace de la phase gazeuse et un renouvellement efficace du fluide autour des cellules ;
- Deuxièmement, les conditions d'agitation du milieu de culture doivent être choisies de manière à assurer le maintien en suspension complète des microporteurs afin de maximiser la surface disponible pour le développement cellulaire et assurer qu'aucune cellule ne sera piégée dans un lit de microporteurs stagnant au fond de la cuve. Ces cellules seraient, en effet, dans un environnement caractérisé par de grosses limitations en transfert de matière.

Le mélange de la phase liquide, la dispersion de la phase gazeuse et le maintien en suspension de la phase solide dépendent également du type de mobile sélectionné et de sa vitesse de rotation. Ils seront tous les trois d'autant plus efficaces que la vitesse de rotation du mobile sera élevée, mais ces conditions correspondent également à un stress hydrodynamique maximal. Il faudra donc, au niveau de la vitesse de rotation du mobile, trouver un compromis pour assurer d'une part les besoins d'homogénéisation et de transfert de matière et d'autre part limiter le stress hydrodynamique puisque ces grandeurs évoluent de manière opposée avec la vitesse de rotation du mobile. La Figure I-5 (page 32) illustre cette nécessité de trouver un compromis pour maximiser les performances des cultures de cellules *Vero* sur microporteurs. Lorsque la vitesse de rotation du mobile à deux pales droites est inférieure à 60 rpm, des problèmes d'homogénéité sont observés. Ces problèmes limitent la croissance cellulaire et ce d'autant plus que la vitesse de rotation du mobile est faible. Par contre, lorsque la vitesse de rotation du mobile dépasse 60 rpm, des problèmes liés au stress hydrodynamique sont observés. En effet, la croissance cellulaire passe par un maximum à la

vitesse de rotation de 60 rpm. Elle diminue ensuite et ce de manière d'autant plus marquée que la vitesse de rotation du mobile augmente.

Les développements présentés dans les paragraphes précédents montrent que le choix du design et des conditions opératoires d'un bioréacteur à cuve agitée, adapté aux besoins des cellules animales adhérentes cultivées sur microporteurs, est une tâche complexe. Ce problème constitue la question centrale du présent travail de thèse. Pour maximiser le mélange tout en minimisant le stress hydrodynamique, divers variables opératoires doivent être optimisées. Ces variables opératoires sont la forme de la cuve, ses dimensions, le design du mobile, sa position dans la cuve et sa vitesse de rotation. Dans le cadre de cette thèse, nous tenterons d'optimiser ces variables opératoires sur base de leur impact sur l'écoulement turbulent. Pour ce faire, nous avons élaboré une méthodologie qui est décrite dans la section suivante.

3 Approche proposée

3.1 Méthodologie

L'objectif de ce travail de thèse est de développer une méthodologie permettant la caractérisation de l'environnement hydrodynamique local rencontré par des cellules animales cultivées sur microporteurs dans un bioréacteur à cuve agitée mécaniquement. Cette caractérisation constituera un outil d'aide à la sélection du design du bioréacteur et des conditions opératoires les mieux adaptées aux besoins des cellules cultivées.

Dans la section précédente, nous avons rappelé que la répartition spatiale de grandeurs caractéristiques de l'écoulement turbulent telles que l'énergie cinétique turbulente k ou son taux de dissipation ε n'était pas uniforme et que leurs valeurs dépendaient de la géométrie de la cuve et du design du mobile d'agitation. Dans tous les cas, les valeurs observées dans la zone proche du mobile sont nettement plus élevées que dans le reste de l'écoulement.

Il faut aussi garder à l'esprit qu'une cellule fixée sur un microporteur ne reste pas fixe au sein du bioréacteur mais se déplace de zone en zone. Du point de vue des « contraintes mécaniques », les cellules cultivées sont donc ainsi soumises à un stress hydrodynamique assez fluctuant au cours du temps puisque les grandeurs caractéristiques de l'écoulement turbulent ne sont pas réparties de manière uniforme dans la cuve. Du point de vue de la « composition chimique », l'environnement des cellules en mouvement peut être considéré comme constant si on peut supposer que le mélange est suffisamment intense au sein de la cuve pour assurer une composition homogène du milieu de culture. C'est généralement le cas pour des bioréacteurs pilotes ou de laboratoire. Dans des bioréacteurs industriels de grande taille, par contre, des gradients de concentration peuvent apparaître.

L'activité cellulaire étant fonction des conditions physico-chimiques et hydrodynamiques rencontrées par la cellule, la méthodologie développée dans le cadre de la présente thèse a pour but de décrire la succession des états physico-chimiques et hydrodynamiques rencontrés par la cellule au cours du temps.

L'étude de l'écoulement turbulent a été divisée en deux étapes.

Dans la première étape, les écoulements turbulents générés par différents types de mobiles axiaux dans une cuve de 20 L ont été étudiés d'un point de vue eulérien. Cette description eulérienne a pour but d'obtenir, sur base des mesures 2D et 3D P.I.V. réalisées au sein de la cuve, des cartes de répartition spatiale des grandeurs turbulentes comme l'énergie cinétique turbulente k , son taux de dissipation ε , les contraintes de cisaillement turbulent τ_{ij} ...

L'impact du design du mobile et des conditions d'agitation a été étudié dans ce cadre. Un exemple typique de résultats obtenus lors d'études eulériennes de l'écoulement a été présenté à la Figure I-4 (page 31). Cette première phase peut sembler peu innovante puisque de nombreuses études eulériennes de l'écoulement turbulent dans une cuve agitée sont disponibles dans la littérature scientifique. Cette étude eulérienne est néanmoins indispensable car le design de la cuve agitée étudiée n'est pas standard. Étant donné que la répartition spatiale des grandeurs caractéristiques de l'écoulement turbulent est étroitement liée à la géométrie de la cuve et au design du mobile, les résultats de littérature ne sont donc pas exploitables directement.

Dans la seconde étape, l'écoulement turbulent dans une cuve agitée est caractérisé par une approche lagrangienne. Cette approche consiste à suivre au cours du temps le chemin parcouru dans le bioréacteur par une particule représentant un élément de fluide. La trajectoire de cette particule est ainsi déterminée. De cette trajectoire, il est possible d'extraire des informations quantitatives qui ne sont pas accessibles à partir d'études eulériennes. Il s'agit principalement de grandeurs temporelles comme la distribution du temps de séjour de la particule dans diverses zones du bioréacteur, la fréquence de retour dans chacune de ces zones, la distribution des intervalles de temps entre deux passages de la particule dans une même zone, ...

Le couplage des deux approches permet de caractériser l'environnement hydrodynamique perçu par des cellules fixées sur la surface d'un microporteur. En effet, à chacune des zones, il est possible d'associer une valeur de stress hydrodynamique sur base des cartes de répartition spatiale obtenues par l'approche eulérienne. L'étude lagrangienne permet ensuite de déterminer la succession des états rencontrés et de tirer des résultats du type : « pour une vitesse d'agitation et un design de mobile donné, un microporteur perçoit en moyenne un stress hydrodynamique d'une intensité X. Il séjourne en moyenne Y secondes dans une zone caractérisée par un stress hydrodynamique d'intensité Z, ... » Puisque les performances d'une culture de cellules animales résultent de l'intégration des conditions physico-chimiques et hydrodynamiques rencontrées par les cellules, le type de résultats évoqué ci-dessus constitue un outil extrêmement précieux pour définir le design du mobile et la vitesse de rotation les mieux adaptés à la culture de cellules animales sur microporteurs.

3.2 Originalité de l'approche

La présente thèse propose donc une méthode dont le but est de caractériser l'environnement hydrodynamique local rencontré par des cellules animales cultivées sur microporteurs dans un bioréacteur à cuve agitée. Cette méthode se base sur l'exploitation des mesures lagrangiennes réalisées grâce à un dispositif expérimental de trajectographie optique et sur le couplage de

cette information lagrangienne avec l'information eulérienne déduite des mesures 2D et 3D P.I.V..

Il s'agit d'une approche tout à fait originale principalement pour deux raisons.

Le premier élément original de cette thèse est le dispositif de trajectographie optique. En effet, il n'existe dans le monde que cinq installations expérimentales permettant de suivre et de mesurer pendant une longue période la trajectoire d'une particule et il n'existe pas de société qui les commercialise. Nous avons donc dû concevoir, construire et mettre au point un dispositif de trajectographie optique pour réaliser l'étude lagrangienne de l'écoulement. Ce dispositif permet de suivre l'évolution au cours du temps de la position tridimensionnelle d'une particule noire d'alginate dont le diamètre est de l'ordre de 500 μm grâce à l'utilisation simultanée de deux caméras et d'un éclairage parfaitement uniforme.

L'équipe du Professeur Villiermaux de l'INPL de Nancy avait développé, à la fin des années 90, un appareil de trajectographie optique basé sur le même principe. L'installation utilisée ici est cependant nettement plus performante car, en dix ans, d'énormes progrès ont été réalisés au niveau de la conception des caméras, de leur modélisation et au niveau de la puissance des ordinateurs. Ces progrès ont permis de réduire la taille de la particule traçante de 4 mm à 500 μm , d'augmenter la précision sur sa position et de réduire très fortement le temps nécessaire au traitement de l'information. A notre connaissance, l'installation développée par Wittmer (1997) et par Pitiot (1999) n'est actuellement plus utilisée.

Plus récemment, les équipes des Professeurs Dudukovic, Ramachandran et Larachi et les équipes du Professeur Barigou ont développé des appareils de trajectographie utilisant une particule radioactive émettant respectivement des rayons γ et des positrons. Dans ce cas, la cuve agitée est donc entourée par des capteurs mesurant les émissions radioactives et permettant de repositionner la particule dans l'espace. Ces appareils de trajectographie sont appelés dans la littérature respectivement la C.A.R.P.T. (Computer Automated Radioactive Particle Tracking) et la P.E.P.T. (Positron Emission Particle Tracking). Il existe deux installations expérimentales C.A.R.P.T., l'une est à l'Université de Washington à St-Louis et l'autre à l'Ecole Polytechnique de Montréal. Il n'existe qu'une installation P.E.P.T. située à l'Université de Birmingham.

Le lecteur averti pourrait contester notre argument concernant la rareté des dispositifs expérimentaux lagrangiens en citant la technique optique de « Particle Tracking Velocimetry » (P.T.V.) qui commence progressivement à se commercialiser et à se répandre dans les laboratoires spécialisés. Cependant, contrairement aux cinq dispositifs présentés ci-dessus qui permettent de mesurer la trajectoire d'une seule particule pendant un temps très long, la P.T.V. permet de mesurer simultanément sur de courtes périodes (1 à 2 s) les trajectoires de plusieurs milliers de particules. L'information extraite de ces fragments de trajectoires n'est pas une information typiquement lagrangienne telle qu'une distribution de temps de séjour mais plutôt une information de type eulérienne à savoir la vitesse instantanée de chaque particule. La technique P.T.V. permet ainsi d'établir les champs instantanés de vitesse dans une fraction volumique de l'écoulement. Elle est donc une évolution des techniques 2D et 3D P.I.V. qui mesurent les champs instantanés de vitesse uniquement dans

un plan. A ce titre, la technique P.T.V. est donc plutôt employée pour réaliser des études eulériennes des écoulements turbulents.

Le couplage des résultats lagrangiens et eulériens est le second élément original de cette thèse. Il existe en effet très peu d'études qui superposent la trajectoire d'une particule à un champ eulérien. A notre connaissance, ceci n'a été réalisé que par Luo *et al.* (2003) qui, pour caractériser les performances d'un photo-bioréacteur, ont superposé les trajectoires mesurées par la technique C.A.R.P.T. d'une particule sensée représenter une micro-algue à la répartition spatiale du champ lumineux au sein du photo-bioréacteur. Le faible nombre d'études qui couplent les données expérimentales lagrangiennes et eulériennes s'explique par la difficulté d'acquérir les informations lagrangiennes vu le peu de dispositifs expérimentaux disponibles. De plus, les données lagrangiennes acquises par les techniques de trajectographie optique, C.A.R.P.T. et P.E.P.T. sont en elles-mêmes très riches et, jusqu'à ce jour, c'est l'exploitation de ces données qui a été présentée dans la littérature lorsqu'une de ces techniques a été employées. Deux exemples typiques de résultats présentés dans la littérature peuvent être cités. Les techniques C.A.R.P.T. et P.E.P.T. n'étant pas limitées à des dispositifs optiquement transparents, elles ont été largement employées pour caractériser la structure de l'écoulement moyen et turbulent de la phase liquide et de la phase solide dans des écoulements di- ou triphasiques (Fishwick *et al.*, 2005 ; Guida *et al.*, 2009, 2010, 2011 ; Pianko-Oprych *et al.*, 2009). Les trois techniques sont également fréquemment employées pour caractériser le mélange dans des dispositifs transparents ou non, *via* divers outils (Pitiot, 1999 ; Martin *et al.*, 2007 ; Doucet *et al.*, 2008; ...) Il existe bien entendu dans la littérature, plusieurs études qui couplent des données lagrangiennes à des données eulériennes, toutes deux obtenues à partir de simulations numériques de l'écoulement (Delafosse, 2008 ; Torré *et al.*, 2008), mais dans ce cas se pose le problème de la fiabilité des résultats obtenus puisque le modèle numérique à la base des données lagrangiennes n'a pas été validé par des mesures expérimentales.

4 Hypothèses de travail

Diverses hypothèses doivent être posées dans cette thèse pour accéder aux résultats. L'hypothèse principale est de supposer que la phase gazeuse, vu son faible taux, et la phase solide, vu sa faible différence de densité et son taux modéré, n'influencent pas la structure de l'écoulement de la phase liquide. Cette hypothèse est nécessaire car nous utilisons tout au long de cette thèse des techniques expérimentales nécessitant des milieux optiquement transparents. Or la présence de bulles de gaz et la présence des microporteurs rendent le milieu opaque.

Nous avons donc sélectionné un liquide optiquement transparent présentant les mêmes propriétés rhéologiques que le milieu de culture contenant les microporteurs. Les résultats de l'étude de rhéologie montre que l'eau est un excellent candidat. Ces résultats sont de plus corroborés par ceux de Batchelor (1977) et Einstein (1906) qui montrent que la viscosité d'un mélange diphasique liquide-solide contenant un faible taux de solide est égale à la viscosité de la phase liquide seule. Les milieux de culture ayant une viscosité égale à celle de l'eau, cette dernière a été utilisée comme fluide modèle.

De plus, les travaux de Guiraud *et al.* (1997) et de Zhu *et al.* (2008) semblent valider l'hypothèse que nous faisons concernant la non-influence des phases solide et gazeuse sur la structure de l'écoulement de la phase liquide.

En effet, Guiraud *et al.* (1997) ont étudié, par la technique LDA, la structure de l'écoulement turbulent diphasique liquide-solide générée par un mobile de type TTP (marque Mixel) dans une cuve agitée de 20 L et l'ont ensuite comparée à celle de l'écoulement turbulent monophasique liquide. Dans leur étude, la phase solide est composée de billes de verre qui sont nettement plus denses que des microporteurs. Leurs résultats montrent clairement que la structure de l'écoulement moyen (Figure I-9) et la structure de la composante turbulente (Figure I-10) ne sont pas influencées par la présence du solide. En effet, aucune différence n'est observée entre les résultats obtenus dans le milieu diphasique (rond blanc) et le milieu monophasique (rond noir).

De même, Zhu *et al.* (2008) montrent grâce à une étude eulérienne basée sur des mesures P.I.V. diphasique, que la structure du champ moyen de vitesse et les caractéristiques de la composante turbulente de l'écoulement ne sont pas modifiées par la présence de bulles de gaz pour autant que le taux d'aération reste inférieur ou égal à 0.05 vvm. Or ce taux d'aération correspond au taux maximal utilisé en culture de cellules animales sur microporteurs. La Figure I-11 et la Figure I-12 illustrent ce propos en montrant le profil de la composante axiale de la vitesse moyenne sous la pale du mobile « Elephant Ear » en l'absence ou en présence de gaz, et la répartition de l'énergie cinétique turbulente k en présence et en absence de gaz.

Ces observations justifient l'utilisation d'une solution aqueuse pour étudier l'impact des conditions d'agitation et du design du mobile sur l'écoulement turbulent dans un bioréacteur à cuve agitée de 20 L.

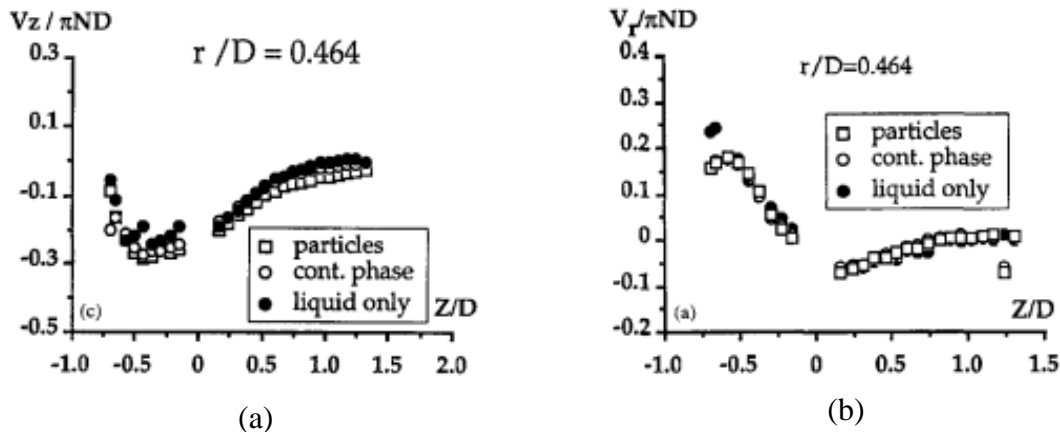


Figure I-9 : Comparaison de la structure de l'écoulement moyen de la phase liquide en présence et en absence de phase solide : Profil axial de la composante (a) axiale (b) radiale de la vitesse moyenne (Guiraud *et al.*, 1997).

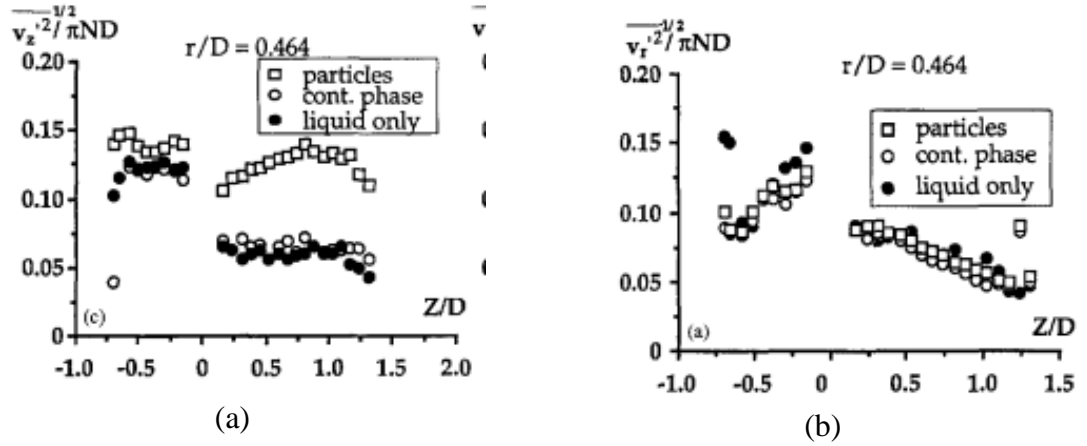


Figure I-10 : Comparaison de la structure de l'écoulement turbulent de la phase liquide en présence et en absence de phase solide : profil axial de la composante (a) axiale, (b) radiale de la moyenne quadratique de la fluctuation de la vitesse (Guiraud et al., 1997).

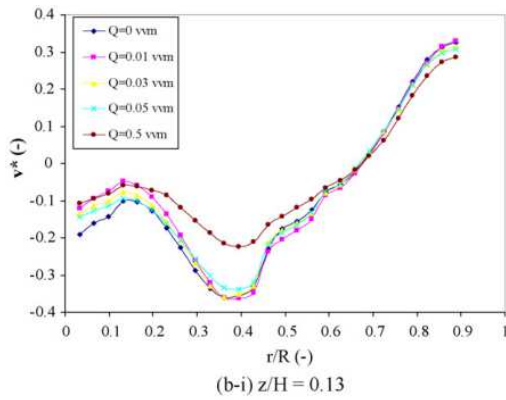


Figure I-11 : Comparaison des profils radiaux de la composante axiale de la vitesse moyenne pour différents taux d'aération (Zhu et al., 2008).

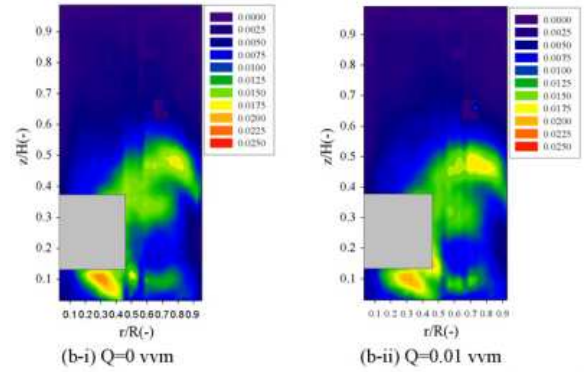


Figure I-12 : Comparaison des champs d'énergie cinétique turbulente obtenus dans la phase liquide en l'absence de gaz (gauche) et en présence d'un taux d'aération de 0.01 vvm (Zhu et al., 2008).

5 Structure de la thèse

L'approche décrite dans la section précédente sera divisée en sept chapitres. Nous avons choisi délibérément de structurer ces chapitres comme s'il s'agissait d'articles scientifiques indépendants composés d'un résumé, une introduction, une section « appareils et méthodes », une section « analyse des résultats » et une conclusion. Nous souhaitons, en effet, que chaque chapitre transmette un message et que les outils utilisés pour construire ce message soient clairement identifiés.

Ainsi, l'étude réalisée au Chapitre II a pour but de sélectionner deux mobiles axiaux auxquels sera appliquée la méthodologie développée dans cette thèse. Pour ce faire, sept mobiles axiaux sont comparés sur base des contraintes mécaniques qu'ils génèrent, estimées à partir de la mesure de la puissance globale dissipée, lorsqu'ils tournent respectivement à leur vitesse minimale de maintien des microporteurs en suspension complète N_{js} . Cette comparaison permet de sélectionner les mobiles TTP 125 ($d/T=0.4$, Mixel) et EE 150 ($d/T=0.5$, Applikon).

Le Chapitre III est consacré à l'étude eulérienne détaillée de l'écoulement turbulent généré par les deux mobiles sélectionnés au chapitre précédent. Sur base de mesures 3D P.I.V., les champs moyens de vitesse dans cinq plans axiaux sont établis et analysés. Ce même exercice est réalisé pour les grandeurs caractéristiques de la composante turbulente de l'écoulement que sont l'énergie cinétique turbulente et son taux de dissipation. Grâce à ces données, la répartition spatiale des contraintes mécaniques au sein de l'écoulement turbulent est établie ; ce qui permet d'identifier au sein de la cuve des zones labélisées comme potentiellement problématiques pour le développement des cellules cultivées sur les microporteurs.

Dans le Chapitre IV, l'impact de gradients de concentration présents au sein de la cuve, suite à une injection de soude par exemple, est évalué. Dans ce but, le mélange au sein du bioréacteur a été étudié de manière globale par la mesure de temps de mélange et de manière locale par la mesure de l'évolution avec le temps de champs de concentration par la technique P.L.I.F. Ces mesures ont montré que le temps d'« existence » des gradients de concentration est nettement inférieur aux temps caractéristiques relatifs à une modification du métabolisme cellulaire. Il en résulte que, dans la suite du travail, les champs de concentration seront supposés comme constants et uniformes au sein de la cuve agitée. Les hétérogénéités ponctuellement présentes après l'ajout de soude ne seront donc pas prises en compte dans la caractérisation Euler-Lagrange de l'écoulement.

La première partie du Chapitre V présente le principe et les outils de modélisation nécessaires à la mise au point et au fonctionnement du dispositif de trajectographie optique conçu et développé dans le cadre de cette thèse. Cette installation, tout à fait originale et unique, permet de suivre la trajectoire d'une particule au sein de la cuve agitée pendant des temps très longs et permet donc d'accéder à l'étude lagrangienne de l'écoulement. La seconde partie du chapitre est consacrée à la caractérisation des trajectoires mesurées. L'isoprobabilité de présence de la particule dans tout volume élémentaire de la cuve agitée a pu être confirmée. La validité et la convergence des résultats obtenus par trajectographie ont pu être vérifiées par comparaison des champs de vitesse calculés à partir des trajectoires avec ceux mesurés par 3D P.I.V.

Au Chapitre VI, les données eulériennes sont combinées aux données lagrangiennes afin de caractériser le lien entre la succession d'environnements hydrodynamiques perçus par des cellules fixées sur des microporteurs et les conditions d'agitation du bioréacteur. Cette caractérisation repose principalement sur l'analyse de la distribution de temps de séjour de la particule dans la zone labélisée comme problématique pour le développement cellulaire DTS_{zone} , de la distribution de temps de séjour de la particule dans la zone non problématique $DTS_{hors\ zone}$ ainsi que sur l'analyse des distributions de temps mis par la particule pour réaliser un cycle « visite de zone problématique-visite de zone non problématique » DT_{cycle} . La taille des zones problématiques et non problématiques dépend de la valeur choisie pour le critère λ_K/d_p , du type de mobile, ainsi que de sa vitesse de rotation. L'impact de ces trois grandeurs sur les distributions de temps a donc été analysé.

Cette thèse se clôture bien naturellement par un chapitre de conclusion résumant les informations acquises et proposant diverses perspectives.

Liste des symboles

d	Diamètre du mobile	[m]
d_p	Diamètre des microporteurs	[m]
k	Energie cinétique turbulente	[J]
l	Distance entre deux lignes de flux	[m]
L	Longueur caractéristique	[m]
m	Masse des microporteurs	[g]
N	Vitesse de rotation du mobile	[tour s ⁻¹]
N_{js}	Vitesse minimale de maintien des microporteurs en suspension complète	[tour s ⁻¹]
N_p	Nombre de puissance du mobile	[-]
P	Puissance globale dissipée	[W]
Re	Nombre de Reynolds	[-]
TCS	Turbulent collision Severity index	[W]
TCS_{eddie}	Turbulent collision Severity index modèle 1	[W]
TCS_{shear}	Turbulent collision Severity index modèle 2	[W]
U	Vitesse caractéristique	[m s ⁻¹]
u	Vitesse instantanée	[m s ⁻¹]
\bar{u}	Vitesse moyenne temporelle	[m s ⁻¹]
u'	Fluctuation de la vitesse	[m s ⁻¹]
$u'_{RMS}, \sqrt{u'^2}$	Moyenne quadratique de la fluctuation de la vitesse	[m s ⁻¹]
v_{br}	Moyenne quadratique de la vitesse relative entre deux microporteurs voisins	[m s ⁻¹]
V	Volume de la cuve	[m ³]
α	Fraction volumique de microporteurs	[%]
γ	Gradient de vitesse au sein d'un tourbillon	[s ⁻¹]
ε	Taux de dissipation de l'énergie cinétique turbulente	[m ² s ³]
ε_{max}	Estimation de la valeur maximale du taux de de dissipation de l'énergie cinétique turbulente	[m ² s ³]
ε_{moyen}	Estimation de la valeur moyenne du taux de dissipation de l'énergie cinétique turbulente	[m ² s ³]
λ_k	Échelle de Kolmogorov	[m]
ν	Viscosité cinématique du fluide	[m ² s]
ρ_l	Masse volumique du fluide	[kg m ⁻³]
ρ_p	Masse volumique des microporteurs	[kg m ⁻³]
τ_{ij}	Contraintes de cisaillement	[N m ⁻²]

Table des figures

<i>Figure I-1 : Classification des bioréacteurs utilisés en culture de cellules animales sur base du mode de transmission de l'énergie mécanique au milieu de culture (Eibl et Eibl, 2009)...</i>	24
<i>Figure I-2 : Design typique d'une cuve agitée. Structure de l'écoulement moyen généré (a) par un mobile axial (b) par un mobile radial.....</i>	27
<i>Figure I-3 : Représentation physique du modèle de la cascade d'énergie de Richardson et Kolmogorov. Illustration issue de Jacquin et Tabelin (2004).</i>	28
<i>Figure I-4 : Non uniformité de la répartition spatiale des grandeurs turbulentes telles que le taux de dissipation de l'énergie cinétique turbulente ε (Baldi et Yianneskis, 2004).....</i>	31
<i>Figure I-5 : L'évolution temporelle de la concentration en cellules Vero cultivées sur microporteurs (3 g L^{-1}) dans un bioréacteur de 250 mL dépend de la vitesse de rotation du mobile. (Hirtenstein et Clark, 1981).....</i>	32
<i>Figure I-6 : Nature des interactions entre les microporteurs et les tourbillons en fonction de leurs tailles relatives.....</i>	33
<i>Figure I-7 : Diminution brutale de la vitesse spécifique de croissance des cellules lorsque la taille de l'échelle de Kolmogorov est inférieure à la moitié de la taille des microporteurs (Croughan et al., 1987).</i>	33
<i>Figure I-8 : Augmentation de la vitesse spécifique de décès des cellules avec la valeur du TCS_{eddies} ou TCS_{shear} exprimée en $10^{-6} \text{ g cm}^2 \text{ s}^{-3}$ ($10^{-13} \text{ J s}^{-1}$) (Cherry et Papoutsakis, 1989).</i>	35
<i>Figure I-9 : Comparaison de la structure de l'écoulement moyen de la phase liquide en présence et en absence de phase solide : Profil axial de la composante (a) axiale (b) radiale de la vitesse moyenne (Guiraud et al., 1997).....</i>	42
<i>Figure I-10 : Comparaison de la structure de l'écoulement turbulent de la phase liquide en présence et en absence de phase solide : profil axial de la composante (a) axiale, (b) radiale de la moyenne quadratique de la fluctuation de la vitesse (Guiraud et al., 1997).....</i>	43
<i>Figure I-11 : Comparaison des profils radiaux de la composante axiale de la vitesse moyenne pour différents taux d'aération (Zhu et al., 2008).....</i>	43
<i>Figure I-12 : Comparaison des champs d'énergie cinétique turbulente obtenus dans la phase liquide en l'absence de gaz (gauche) et en présence d'un taux d'aération de 0.01 vvm (Zhu et al., 2008).....</i>	43

Bibliographie

Baldi, S., Yianneskis, M., 2004. On the quantification of energy dissipation in the impeller stream of a stirred vessel from fluctuating velocity gradient measurements. *Chemical Engineering Science* 59, 2659–2671.

Batchelor, G.K., 1977. The effect of Brownian motion on the bulk rate in a suspension of spherical particles. *Journal of Fluid Mechanics Digital Archive* 83, 97-117.

Bittorf, K.J., Kresta, S.M., 2000. Active volume of mean circulation for stirred tanks agitated with axial impellers. *Chemical Engineering Science* 55, 1325-1335.

Bugay, S., Escudié, R., Liné, A. 2002. Experimental analysis of hydrodynamics in axially agitated tank. *AIChE Journal* 48, 463-475.

Cherry, R.S., Papoutsakis, E.T., 1986. Hydrodynamic effects on cells in agitated tissue culture reactors. *Bioprocess Engineering* 1, 29-41.

Cherry, R.S., Papoutsakis, E.T., 1988. Physical-mechanisms of cell-damage in microcarrier cell-culture bioreactors. *Biotechnology and Bioengineering* 32, 1001-1014.

Cherry, R.S., Papoutsakis, E.T., 1989. Growth and death rates of bovine embryonic kidney cells in turbulent microcarrier bioreactors. *Bioprocess Engineering* 4, 81-89.

Chisti, Y., 2000. Animal-cell damage in sparged bioreactors. *Trends in Biotechnology* 18, 420-432.

Croughan, M.S., Hamel, J.F., Wang, D.I.C., 1988. Effects of microcarrier concentration in animal cell culture. *Biotechnology and Bioengineering* 32, 975-982.

Croughan, M.S., E.S. Sayre, and D.I.C. Wang, 1989. Viscous reduction of turbulence damage in animal-cell culture. *Biotechnology and Bioengineering* 33, 862-872.

Croughan, M.S., Hamel, J.F., Wang, D.I.C., 2006. Hydrodynamic effects on animal cell grown in microcarrier cultures. *Biotechnology and Bioengineering* 95, 295-305.

Delafosse, A. 2008. Analyse et étude numérique des effets de mélange dans un bioréacteur. Thèse de Doctorat, INSA Toulouse, France.

Doucet, J., Bertrand, F., Chaouki, J., 2008. A measure of mixing from lagrangian tracking and its application to granular and fluid flow systems. *Chemical Engineering Research and Design* 86. 1313-1321.

- Ducci, A., Yianneskis, M., 2006. Turbulence kinetic energy transport processes in the impeller stream of stirred vessels. *Chemical Engineering Science* 61, 2780–2790.
- Eibl, D., Eibl, R., 2009. Chapitre 3: Bioreactors for mammalian cells: general overview. *Cell and tissue reaction engineering: principles and practice*. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg.
- Eibl, D., Eibl, R., Pörtner, R., 2009. Chapitre 1: Mammalian cell culture technology: An emerging field. *Cell and tissue reaction engineering: principles and practice*. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg.
- Einstein, A., 1906. Eine neue Bestimmung der Moleküldimensionen. *Annalen der Physik* 324, 289-306.
- Enders, J.F., Weller T.H., Robbins F.C., 1949. Cultivation of Lansing strain of poliomyelitis virus in cultures of various human embryonic tissues. *Science* 109, 85.
- Escudié, R., Liné, A., 2003. Experimental analysis of hydrodynamics in a radially agitated tank. *AIChE Journal* 49, 585-603.
- Escudié, R., Bouyer, D., Liné, A., 2004. Characterization of trailing vortices generated by a rushton turbine. *AIChE Journal* 50, 75-86.
- Escudié, R., Liné, A., 2006. Analysis of turbulence anisotropy in a mixing tank. *Chemical Engineering Science* 61, 2771 – 2779.
- Fishwick, R.P., Winterbottom, J.M., Parker, D.J., Fan, X., Stitt, E.H., 2005. Hydrodynamic measurements of up- and down-pumping pitched blade turbines in gassed, agitated vessels, using positron emission particle tracking. *Industrial Engineering Chemical Research* 44, 6374-6380.
- Harrison, R.G., 1907. Observations on the living developing nerve fiber. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* 4, 140.
- Gabriele, A., Nienow, A.W., Simmons, M.J.H., 2009. Use of angle resolved PIV to estimate local specific energy dissipation rates for up- and down-pumping pitched blade agitators in a stirred tank. *Chemical Engineering Science* 64, 126 -143.
- Guida, A., Fan, X., Parker, D.J., Nienow, A.W., Barigou, M., 2009. Positron emission particle tracking in a mechanically agitated solid-liquid suspension of coarse particles. *Chemical Engineering Research and Design* 87, 421-429.

Guida, A., Nienow, A.W., Barigou, M., 2010. PEPT measurements of solid-liquid flow field and spatial phase distribution in concentrated monodisperse stirred suspensions. *Chemical Engineering Science* 65, 1905-1914.

Guida, A., Nienow, A.W., Barigou, M., 2011. Mixing of dense binary suspension: multi-component hydrodynamics and spatial phase distribution by PEPT. *AIChE Journal* 57, 2302-2315.

Guiraud, P., Costes, J., Bertrand J., 1997. Local measurements of fluid and particle velocities in a stirred suspension. *Chemical Engineering Journal* 68, 75-86.

Hirtenstein, M.D., Clark, J., 1980. *Tissue Culture in Medical Research*. Pergamon, Oxford.

Huchet, F., Liné, A., Morchain, J., 2009. Evaluation of local kinetic energy dissipation rate in the impeller stream of a Rushton turbine by time-resolved PIV. *Chemical Engineering Research and Design* 87, 369-376.

Jacquín, L., Tabelin, P., 2004. *Turbulence and Tourbillons*. Note de cours de l'Ecole Polytechnique Paris, France.

Jaworski, Z., Dyster, K.N., Nienow, A.W., 2001. The effect of size, location and pumping direction of pitched blade turbine impellers on flow patterns: LDA measurement and CFD predictions. *Chemical Engineering Research and Design* 79, 887-894.

Jenkins, N., 2007. Modifications of therapeutic proteins: challenges and prospects. *Cytotechnology* 53, 121-125.

Khan, F.R., 2005. Investigation of turbulent flows and instabilities in a stirred vessel using particle image velocimetry. Thèse de doctorat, Loughborough University, United Kingdom.

Khan, F.R., Rielly, C.D., Brown, D.A.R., 2006. Angle-resolved stereo-PIV measurements close to a down-pumping pitched-blade turbine. *Chemical Engineering Science* 61, 2799 – 2806.

Kilander, J., Rasmuson, A., 2005. Energy dissipation and macro instabilities in a stirred square tank investigated using an LE PIV approach and LDA measurements. *Chemical Engineering Science* 60, 6844-6856.

Kresta, S.M., Wood, P.E., 1993. The flow field produced by a pitched blade turbine: characterization of the turbulence and estimation of the dissipation rate. *Chemical Engineering Science* 48, 1761-1774.

- Kresta, S.M., 1998, Turbulence in stirred tanks: anisotropic, approximate, and applied. *Canadian Journal Chemical Engineering* 76, 563–576.
- Kretzmer, G., 2002. Industrial processes with animal cells. *Applied Microbiology Biotechnology* 59, 135–142.
- Kumaresan, T., Joshi, J.B., 2006. Effect of impeller design on the flow pattern and mixing in stirred tanks. *Chemical Engineering Journal* 115, 173–193.
- Lakhotia, S., Papoutsakis, E.T., 1992. Agitation induced cell injury in microcarrier cultures. Protective effect of viscosity is agitation intensity dependent: experiments and modeling. *Biotechnology and Bioengineering* 39, 95–107.
- Luo, H.P., Kemoun, A., Al-Dahhan, M.H., Fernandez Sevilla, J.M., Garcia Sanchez, J.L., Garcia Comacho, F., Malina Grima, E., 2003. Analysis of photobioreactors for culturing high value microalgae and cyanobacteria *via* advanced diagnostic technique: CARPT. *Chemical Engineering Science* 58, 2519–2527.
- Maitland, H.B., Maitland M.C., 1928. Cultivation of vaccinia virus without tissue culture. *Lancet* 215, 596.
- Marc, A., Olmos, E., 2010. Procédés de culture en masse de cellules animales. Fascicule T.I bio 6800 des Techniques de l'Ingénieur, Edition T. I., Paris, France.
- Martin, T.W., Seville, J.P.K., Parker, T.J., 2007. A general method for quantifying dispersion in multiscale system using trajectory analysis. *Chemical Engineering Science* 62, 3419–3428.
- Micheletti, M., Baldi, S., Yeoh, S.L., Ducci, A., Papadakis, G., Lee, K.C., Yianneskis, M., 2004. On spatial and temporal variations and estimates of energy dissipation in stirred reactors. *Chemical Engineering Research and Design* 82, 1188–1198.
- Ng, K., Yianneskis, M., 2000. Observations on the distribution of energy dissipation in stirred vessels. *Chemical Engineering Research and Design* 78, 334–341.
- Papoutsakis, E.T., 1991. Fluid-mechanical damage of animal cells in bioreactors. *Trends in Biotechnology* 9, 427–437.
- Pianko-Oprych, P., Nienow, A.W., Barigou, M., 2009. Positron emission particle tracking (PEPT) compared to particle image velocimetry (PIV) for studying the flow generated by a pitched-blade turbine in single and multi-phase systems. *Chemical Engineering Science* 64, 4955–4968.

Pitiot, P., 1999. Caractérisation par trajectographie tridimensionnelle du mélange dans un réacteur agité. Thèse de doctorat, Institut National Polytechnique de Lorraine, Nancy, France.

Pope S.B., 2000. Turbulent Flow. Cambridge University Press, Cambridge.

Pörtner, R., 2009. Chapitre 2: Characteristics of mammalian cells and requirements for cultivation. Cell and tissue reaction engineering: principles and practice. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg

Sheng, J., Meng, H., Fox, R.O., 2000. A large eddy PIV method for turbulence dissipation rate estimation. Chemical Engineering Science 55, 4423–4434.

Stathopoulos, N.A., Hellums, J.D., 1985. Shear stress effects on human embryonic kidney cells in vitro. Biotechnology Bioengineering 27, 1021-1026.

Torré, J.P., Fletcher, T.F., Lasuye, T., Xuereb, C., 2008. An experimental and CFD study of liquid jet injection into a partially baffled mixing vessel: A contribution to process safety by improving quenching of runaway reactions. Chemical Engineering Science 63, 924-942.

Walsh, G., 2010. Second-generation biopharmaceuticals. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics 58, 185–196.

Wittmer, S., Vivier, H., Villiermaux, J., 1997. Characterization of mixing by analysis of particles trajectories. Récents Progrès en Génie des Procédés, vol 11.

Wu, S.C., 1999. Influence of hydrodynamic shear stress on microcarrier-attached cell growth: Cell line dependency and surfactant protection. Bioprocess Engineering 21, 201-206.

Xuereb, C., Poux, M., Bertrand, J. 2006. Agitation et Mélange : Aspects fondamentaux et applications industrielles. Editions L'Usine Nouvelle, Dunod, Paris

Zhou, G., Kresta, S.M., 1996. Impact of geometry on the maximum turbulence energy dissipation rate for various impellers. AIChE. Journal 42, 2476–2490.

Zhou, G., Kresta, S.M., 1998. Correlation of mean drop size and minimum drop size with the turbulence energy dissipation and the flow in an agitated tank. Chemical Engineering Science 53, 2063–2079.

Zhu, H., Nienow, A.W., Bujalski, W., Simmons, M.J.H., 2009. Mixing studies in a model aerated bioreactor equipped with an up- or a down-pumping 'Elephant Ear' agitator: Power, hold-up and aerated flow field measurements. Chemical Engineering Research and Design 87, 307-317.

Chapitre II :

Sélection de mobiles axiaux pour la culture de cellules animales adhérentes sur microporteurs dans un bioréacteur à cuve agitée : Méthodologie basée sur la comparaison des mobiles à leur vitesse minimale de maintien des microporteurs en suspension complète N_{js}

Résumé.....	56
1 Introduction.....	57
2 Appareils et méthodes.....	60
2.1 Design de la cuve.....	60
2.2 Caractérisation des microporteurs et N_{js}	62
2.3 Dispositif 2D P.I.V.	63
2.4 Puissance globale dissipée.....	66
2.5 Caractérisation des contraintes mécaniques.....	67
3 Résultats.....	69
3.1 Comparaison des sept mobiles à leur vitesse de rotation respective N_{js}	69
3.2 Comparaison des sept mobiles à des vitesses de rotation N correspondant à des facteurs multiplicatifs de N_{js}	76
4 Conclusion.....	78
Annexe II-1 : Traitement appliqué sur les images brutes acquises par la caméra P.I.V. pour obtenir les champs instantanés de vitesse	80
Annexe II-2 : Mise en évidence de la nature turbulente de l'écoulement dans les conditions d'agitation étudiées dans ce travail	84
Annexe II-3 : Comparaison des nombres de puissance et de pompage mesurés dans ce travail par rapport aux valeurs annoncées dans la littérature	89
Liste des symboles.....	93
Table des figures	95
Table des tableaux	97
Bibliographie	98

Résumé

Comme mentionné dans le Chapitre I, le choix du design du mobile, des conditions d'agitation et du design de la cuve qui sont adaptés à la culture de cellules animales adhérentes sur microporteurs en cuve agitée n'est pas une tâche aisée. En effet, ce choix doit résulter d'un compromis entre, d'une part, un besoin de mélange de la phase liquide et de maintien en suspension complète de la phase solide et, d'autre part, une limitation des contraintes mécaniques générées au sein de la phase liquide. *A priori*, un mobile de type axial permet de mieux concilier ces besoins antagonistes qu'un mobile radial car il génère un pompage effectif du liquide qui maintient les microporteurs en suspension complète même à des vitesses de rotation relativement faibles. Cependant, la liste des mobiles axiaux disponibles est longue. Il n'est pas envisageable d'appliquer la méthodologie décrite au Chapitre I à tous ces mobiles.

L'étude présentée dans ce chapitre a donc pour but de sélectionner deux mobiles axiaux qui seront étudiés plus en détails dans les chapitres suivants. Sept mobiles axiaux ont été présélectionnés sur base de leur design et des informations disponibles dans la littérature. Il s'agit de deux mobiles TTP (Mixel) avec des diamètres respectifs de 125 mm et 150 mm, de deux mobiles A315 (Lightnin) avec des diamètres respectifs de 125 mm et 150 mm, d'un mobile A310 (Lightnin) avec un diamètre de 156 mm, d'un mobile de la marque VMI Rayneri avec trois pales profilées et un diamètre de 160 mm et, enfin, d'un mobile de type « Elephant Ear » (Applikon) avec un diamètre de 150 mm. La méthodologie adoptée pour sélectionner les deux mobiles les mieux adaptés parmi les sept présélectionnés est originale. En effet, les mobiles ne sont pas comparés à même vitesse de rotation ou même puissance dissipée, comme cela est généralement fait dans la littérature. Ils sont comparés à leur vitesse minimale respective de maintien en suspension complète des microporteurs N_{js} car il s'agit d'un paramètre clé du procédé. Elle est déterminée expérimentalement par l'analyse visuelle du comportement de la suspension en fonction de la vitesse de rotation.

Les mobiles sont comparés sur base de l'écoulement moyen et du stress hydrodynamique qu'ils génèrent à cette vitesse de rotation N_{js} . L'écoulement moyen est décrit à l'aide de mesures 2D P.I.V. réalisées dans un plan vertical de la cuve passant par son axe de symétrie et en supposant que l'écoulement est axisymétrique. Le stress hydrodynamique généré par les mobiles est quantifié à partir des mesures de la puissance globale dissipée et des modèles décrits au Chapitre I. L'évolution de ces grandeurs est également déterminée pour des vitesses de rotation supérieures à la vitesse minimale de maintien en suspension complète car des agrégats de microporteurs peuvent apparaître en cours de culture. Il faudra alors augmenter la vitesse de rotation pour parvenir à maintenir ces agrégats en suspension complète. Les vitesses de rotation supérieures à N_{js} sont exprimées comme des facteurs multiplicatifs de celle-ci, soit $x N_{js}$.

L'analyse de l'écoulement moyen montre que les mobiles génèrent des écoulements moyens remarquablement similaires lorsque les mobiles tournent à leur vitesse N_{js} ou à un facteur multiplicatif x de celle-ci. Cette analyse met clairement en évidence que les mobiles EE 150 et TTP 125 génèrent les niveaux de stress hydrodynamique les plus faibles et sont donc les mieux adaptés à la culture de cellules animales.

1 Introduction

Comme présenté au Chapitre I, les cellules animales sont, de nos jours, cultivées industriellement dans des bioréacteurs à cuves agitées pour produire des composés protéinés. Certains types de cellules doivent adhérer à un support solide pour grandir et se reproduire. Pour maximiser la surface disponible pour le développement cellulaire, ces cellules sont généralement cultivées sur des microporteurs de type Cytodex1TM maintenus en suspension dans la cuve agitée. Cependant, l'optimisation des conditions d'agitation est assez complexe dans ce type de procédé. En effet, le design du mobile, son diamètre, sa position et sa vitesse de rotation doivent être choisis pour rencontrer les deux objectifs suivants :

- Maintenir en suspension complète les microporteurs afin de maximiser la surface disponible pour le développement des cellules animales ;
- Maintenir autour de chaque cellule une concentration homogène des divers nutriments présents au sein du milieu de culture.

Ces deux objectifs sont aisément atteints en agitant vigoureusement le milieu de culture. Mais, comme les études présentées au Chapitre I le montrent, les cellules animales et en particulier celles adhérant sur des microporteurs sont sensibles aux contraintes mécaniques générés au sein de l'écoulement par :

- Les contraintes de cisaillement produites à la surface des cellules par des tourbillons dont la taille est égale ou inférieure à la taille des microporteurs ;
- Les collisions des microporteurs entre eux.

Le choix du type de mobile et de sa vitesse de rotation doit dès lors résulter d'un compromis entre un besoin d'homogénéisation de la phase solide et de la phase liquide, d'une part, et un besoin de limitation des contraintes mécaniques ressenties par les cellules, d'autre part. *A priori*, un mobile de type axial devrait mieux concilier ces deux besoins qu'un mobile radial. En effet, les mobiles axiaux sont réputés pour créer un pompage effectif du fluide au sein du bioréacteur, ce qui favorise le maintien en suspension des microporteurs même pour de faibles vitesses de rotation (Ibrahim et Nienow, 2004).

Cependant, un rapide coup d'œil dans la littérature scientifique (Roustan, 2005) met en évidence la diversité des designs existants. Le mobile axial au design le plus simple est la turbine à pales inclinées (Figure II-1). Il en existe diverses versions se différenciant par le nombre de pales et l'inclinaison de ces dernières. De nombreuses études (Firoz *et al.*, 2004, Jaworski *et al.*, 2001, Schafer *et al.*, 1998) sur la structure de l'écoulement généré par ces turbines à pales inclinées montrent que la présence de vortex à l'extrémité des pales limitent l'efficacité de l'écoulement axial. Le design des turbines à pales inclinées a dès lors été progressivement modifié pour augmenter ses performances. Comme le montre la Figure II-1, ces modifications peuvent être l'ajout de torsion dans la forme de la pale, le biseautage de leurs extrémités, une variation de l'épaisseur ou de la hauteur de la pale, ... Les effets de ces modifications sur la structure de l'écoulement moyen, sur la structure de la composante turbulente et sur la répartition des contraintes mécaniques ont été étudiés entre autres par Kumaresan et Joshi (2006) et Ranade et Joshi (1989). À côté des turbines à pales inclinées, diverses compagnies ont développé des mobiles au design complexe et aux pales profilées

(Figure II-2). Les plus connus et les plus étudiés dans la littérature sont les mobiles : « Cheminer HE-3, Prochem Maxflo T, Lighnin A310, Lightnin A315, Mixel TTP ». Diverses études comparatives ont montré que ces mobiles au design profilé nécessitent, pour une même circulation de liquide dans la cuve, une puissance globale dissipée P nettement moindre qu'une turbine à pales inclinées. Ils sont donc nettement plus efficaces. (Aubin *et al.*, 2001 ; Jaworski *et al.*, 1996 ; Mavros *et al.*, 1998 ; Wu *et al.*, 2006 ; Zhou et Kresta, 1996a ; ...) Actuellement, des mobiles axiaux aux pales larges et à l'encombrement solide important sont de plus en plus utilisés pour la culture de cellules animales sur microporteurs en cuve agitée. En effet, ils sont réputés pour générer de faibles contraintes de cisaillement étant donné la forme de leurs pales. Le mobile « Elephant Ear » de la marque Applikon ou le mobile B2 de la marque Hayward Tyler (Figure II-3) font partie de cette catégorie. Venkat et Chalmers (1996) ont décrit, à partir de mesures P.T.V., l'écoulement généré par un mobile « Elephant Ear (EE) » dans les conditions typiques de la culture de cellules animales. Zhu *et al.* (2009) ont étudié le champ moyen de vitesse, la distribution de l'énergie cinétique turbulente et le champ de vorticité généré par un mobile EE grâce à des mesures P.I.V. réalisées en présence et en absence d'une phase gazeuse lorsque le mobile pompe le fluide de bas en haut, ainsi que lorsqu'il pompe le fluide de haut en bas. Simmons *et al.* (2007) ont étudié les écoulements générés par le mobile EE et le mobile B2 avec celui généré par une turbine à pales inclinées à même vitesse de rotation, sur base des mesures P.I.V. et de puissance. En comparant les champs moyens de vitesse, la puissance globale dissipée et la répartition de l'énergie cinétique turbulente obtenus à même vitesse de rotation, ils ont conclu qu'il n'existe aucune preuve que les mobiles à larges pales génèrent moins de contraintes de cisaillement qu'une turbine traditionnelle à pales inclinées.

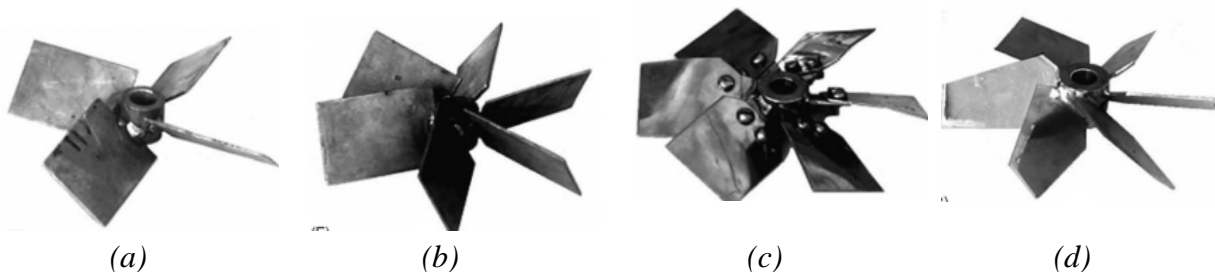


Figure II-1 : Mobile de type : (a) Turbine à 4 pales inclinées classique, (b) Turbine à 6 pales inclinées classique, (c) et (d) Turbines à 6 pales inclinées aux designs modifiés.

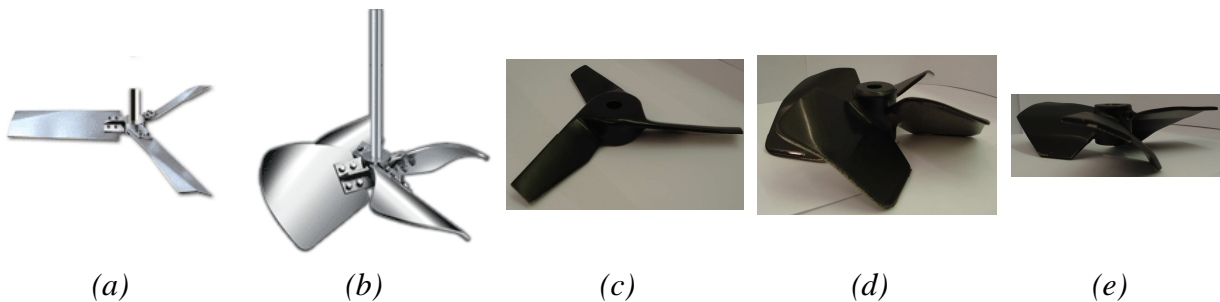


Figure II-2 : Mobile de type : (a) Cheminer HE-3, (b) Prochem Maxflo T, (c) Lighnin A310, (d) Lightnin A315, (e) Mixel TTP.



(a)



(b)

Figure II-3 : Mobile de type (a) B2 de Hayward Tyler et (b) « Elephant Ear » d'Applikon.

Cette brève discussion montre que choisir, dans la large gamme de mobiles axiaux disponibles sur le marché, le mieux approprié pour maintenir les microporteurs en suspension, homogénéiser le milieu de culture et limiter les contraintes mécaniques n'est pas une tâche aisée. L'objectif de ce chapitre est de mettre au point une méthodologie permettant de sélectionner deux mobiles répondant aux trois critères mentionnés juste avant. Afin de limiter cette étude comparative à un nombre raisonnable de mobiles, sept mobiles ont été présélectionnés sur base des informations disponibles dans la littérature.

Comme ces mobiles ont tous des designs et des caractéristiques assez différents, leur comparaison à même vitesse de rotation ou à même puissance dissipée est un peu arbitraire et manque un peu de sens. Il est plus judicieux de les comparer sur base d'un critère lié au procédé. Comme le rôle principal du mobile est de maintenir les microporteurs en suspension complète pour maximiser la surface disponible pour le développement cellulaire, les mobiles seront comparés sur base de l'écoulement moyen et des contraintes mécaniques qu'ils génèrent lorsqu'ils tournent à leur vitesse de rotation minimale de maintien des microporteurs en suspension complète, N_{js} . Cette vitesse de rotation N_{js} est déterminée expérimentalement par l'observation visuelle du comportement de la suspension. L'écoulement moyen est décrit à l'aide de mesures 2D P.I.V. réalisées dans un plan vertical de la cuve passant par son axe de symétrie et en supposant que l'écoulement est axisymétrique. Le stress hydrodynamique généré par les mobiles est quantifié à partir de mesures de la puissance globale dissipée et des modèles décrits au Chapitre I. Nous tenons à faire remarquer que l'approche basée sur la comparaison des mobiles à leur vitesse de rotation N_{js} respective est originale. À notre connaissance, aucun auteur dans la littérature n'a comparé l'écoulement et le stress hydrodynamique généré par des mobiles axiaux sur cette base. Les mobiles ne seront pas uniquement comparés à la vitesse de rotation N_{js} ; ils seront également comparés à des vitesses de rotation supérieures car divers auteurs (Cherry et Papoutsakis, 1988) ont rapporté que des cellules animales peuvent se fixer simultanément sur plusieurs microporteurs en cours de culture, formant ainsi des agrégats qui ne sont pas maintenus en suspension complète à N_{js} . Cependant, pour rester dans la philosophie adoptée dans ce chapitre, les vitesses de rotation plus élevées seront exprimées, pour chaque mobile, comme des facteurs multiplicatifs de leur vitesse de rotation N_{js} , soit $x N_{js}$.

2 Appareils et méthodes

2.1 Design de la cuve

Le design de la cuve utilisée tout au long de ce travail de thèse est illustré à la Figure II-4. Cette cuve est parfaitement transparente et est fabriquée en verre borosilicaté. Son fond est hémisphérique. Son diamètre interne T est de 300 mm. Lorsqu'elle est remplie sur une hauteur H égale à son diamètre interne T , elle a une contenance de 20 L. Deux contre-pales en plexiglas sont disposées long de sa paroi à des positions diamétralement opposées. Leur largeur équivaut au dixième du diamètre interne de la cuve ($b = T/10 = 30$ mm) et leur épaisseur est égale à 2 mm. Leur hauteur et leur position sont telles qu'elles couvrent uniquement la zone cylindrique, *i.e.* qu'elles ne couvrent pas la zone incurvée du fond hémisphérique. Elles sont donc immergées sur une hauteur h de 172 mm. L'axe de rotation du mobile est un barreau métallique cylindrique ($\varnothing = 10$ mm) dont l'axe de symétrie coïncide avec celui de la cuve. Un mobile d'agitation de type « axial » est fixé en bout d'axe. Le plan horizontal coupant ce mobile à la moitié de sa hauteur est distant du fond de la cuve d'une hauteur Y égale au tiers de la hauteur de liquide dans la cuve ($Y = H/3 = 100$ mm). Le diamètre du mobile d'agitation sera noté d dans la suite de ce travail.

L'axe et le mobile sont mis en rotation par un moteur Heidolph (RZR 2102 Control, 100 W) qui permet le contrôle la vitesse de rotation N avec une précision de plus ou moins un tour par minute (rpm). Le mobile tourne dans le sens horlogique et exerce un pompage du liquide vers le bas.

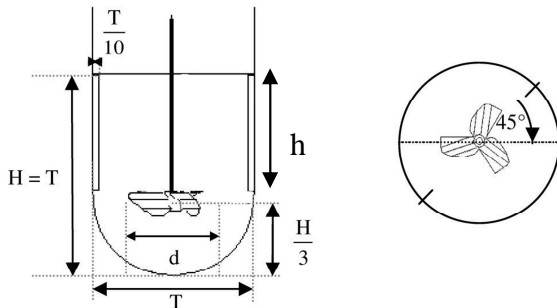


Figure II-4 : Design de la cuve utilisée dans ce travail.

Tableau II-1: Caractéristiques géométriques de la cuve utilisée dans ce travail.

V	20 L
T	300 mm
$H = T$	300 mm
$Y = T/3 = H/3$	100 mm
$b = T/10$	30 mm
h	172 mm

Comme le montre la Figure II-5, la cuve en verre est disposée dans un aquarium parallélépipédique en plexiglas rempli du même liquide que la cuve. Ce montage a pour but de limiter, d'une part, les déformations optiques dues à la forme incurvée de la cuve en verre et de réduire, d'autre part, les déformations dues à la réfraction des rayons lumineux à travers les différents matériaux. L'ensemble est placé sur une structure composée de profilés en aluminium. Cette structure supporte également un miroir de qualité optique incliné à 45° par rapport à l'horizontale. Ce miroir permet d'observer la cuve par le dessous.

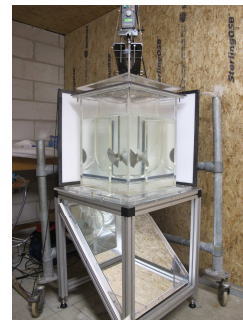


Figure II-5 : Montage optique composé de la cuve, de l'aquarium et de la table en profilé aluminium supportant le miroir incliné à 45° .

Les mobiles présélectionnés ont des designs très différents. Leur forme et leurs caractéristiques sont décrites dans les Figures II-6 à II-10 et dans le Tableau II-2. Le rapport entre le diamètre du mobile d et le diamètre de la cuve T varie entre 0.42 et 0.53 suivant le mobile.

L'hélice TTP de la firme Mixel (Figure II-6) est un mobile axial composé de trois pales incurvées et inclinées d'un angle moyen de 45° . Comme le montre la Figure II-6, la pale est composée de quatre paliers successifs. Elle a une épaisseur de 2 mm et une hauteur de 27 mm. Deux diamètres de mobile sont testés : 125 mm et 150 mm.

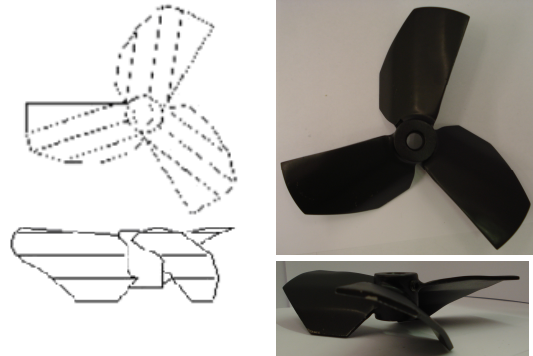


Figure II-6 : Design des mobiles TTP (Mixel).

L'hélice A315 de la marque Lightnin (Figure II-7) est un mobile axial composé de quatre pales. La Figure II-7 montre que la totalité de la pale est inclinée à 45° , à l'exception de l'extrémité supérieure. Deux mobiles de ce type sont utilisés. Le premier a un diamètre de 125 mm et une hauteur de pale de 35 mm. Le second a un diamètre de 150 mm et une hauteur de pale de 45 mm.

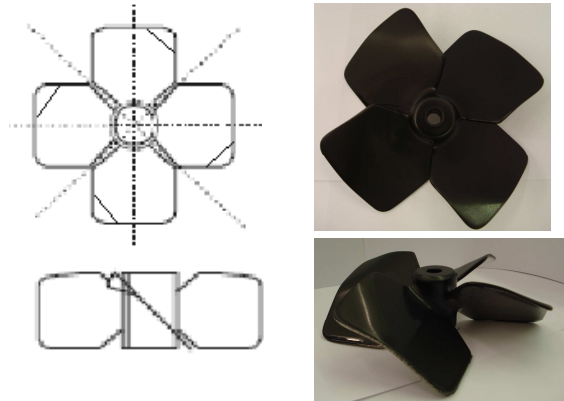


Figure II-7 : Design des mobiles A315 (Lightnin).

L'hélice A310 (Figure II-8) de la marque Lightnin est un mobile axial constitué de trois pales légèrement arrondies et inclinées à 45° . Chaque pale a une épaisseur de 3 mm et une hauteur de 15 mm. Le diamètre de l'hélice est de 156 mm.

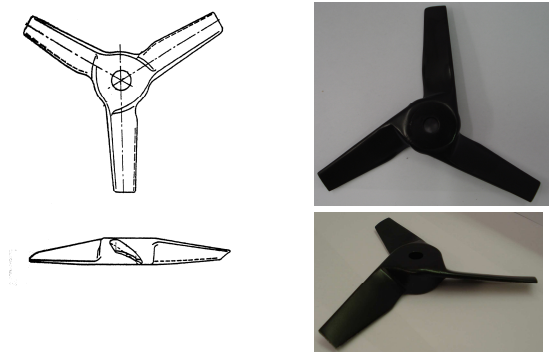


Figure II-8 : Design du mobile A310 (Lightnin).

Le mobile « Three Streamed Blades » (3SB) de fabrication VMI (Figure II-9) est un mobile axial composé de trois pales inclinées de 45° . La pale est constituée de trois plateaux. Son épaisseur est de 2 mm, sa hauteur de 15 mm. Le diamètre du mobile est de 160 mm.

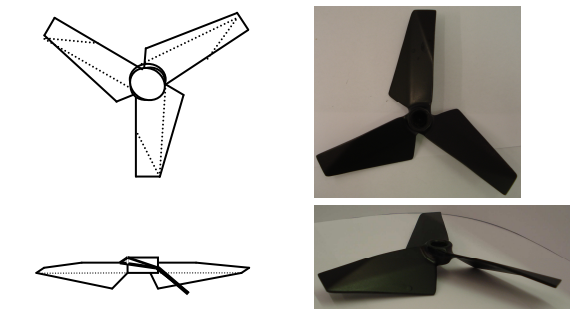


Figure II-9 : Design du mobile 3SB (VMI).

Enfin, le **mobile Elephant Ear (EE)** de la marque Applikon (Figure II-10) est un mobile axial composé de trois pales droites inclinées à 45°. L'épaisseur des pales est de 1 mm et leur hauteur de 95 mm. Le diamètre du mobile est de 150 mm.

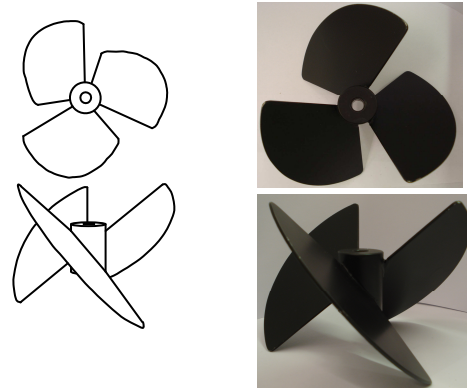


Figure II-10 : Design du mobile EE (Applikon).

Dans la suite de ce travail, les mobiles seront désignés par leur type (TTP, A315, A310, 3SB, EE) suivi d'un nombre correspondant à leur diamètre exprimé en mm (125, 150, 156, 160).

Tableau II-2 : Caractéristiques géométriques des mobiles utilisés dans ce travail.

Mobile	Diamètre d (mm)	Hauteur W (mm)	Epaisseur e (mm)	% du volume de la cuve balayé par le mobile : $V_{swept} = \frac{\pi d^2 W}{4}$
EE 150	150	95	1	8.39
TTP 125	125	27	2	1.65
TTP 150	150	27	2	2.39
A310 156	156	15	3	1.43
A315 125	125	35	2	2.14
A315 150	150	45	2	3.98
3SB 160	160	15	2	1.50

2.2 Caractérisation des microporteurs et N_{js}

Les propriétés physiques des microporteurs de type Cytodex1TM utilisés dans ce travail sont repris dans le Tableau II-3.

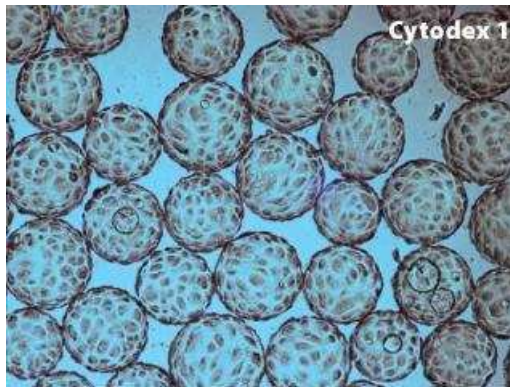


Figure II-11 : Cytodex1TM avec des cellules animales adhérentes à leur surface.

Tableau II-3 : Propriétés physiques des microporteurs Cytodex1TM.

Cytodex1 TM	
Taille (μm)	200 à 380
Masse volumique (kg m ⁻³)	1030
Concentration (g L ⁻¹)	9
Concentration (% vol)	18.54

Pour maximiser la surface disponible pour le développement cellulaire, chaque microporteur doit être maintenu en suspension. Néanmoins, il n'est pas obligatoire que la concentration en

microporteurs soit homogène dans l'ensemble du bioréacteur. Ainsi, pour des raisons d'économie (limitation de la puissance du moteur et de l'énergie consommée), la vitesse de rotation du mobile d'agitation est généralement choisie pour maintenir la phase solide en suspension complète (Figure II-12) et non en suspension uniforme. Il faut donc déterminer pour chaque mobile la vitesse de rotation minimale à partir de laquelle aucun microporteur ne stagne au fond de la cuve plus de 2 ou 3 s. Cette vitesse définit la transition entre une suspension partielle et une suspension complète. Le critère définissant cette vitesse de rotation minimale a été défini en premier lieu par Zwietering (1958). Il a désigné cette vitesse de rotation par « Just-suspended speed » et l'a symbolisée par le symbole N_{js} . Ce critère et ces notations sont encore de nos jours largement utilisés dans la littérature scientifique (Ibrahim et Nienow, 2004 ; Myers *et al.*, 1994...)

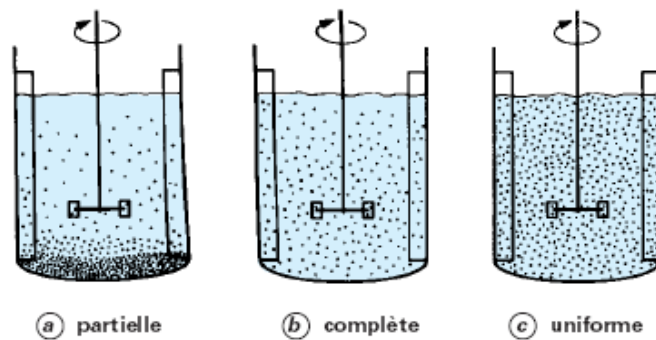


Figure II-12 : Illustration de suspensions (a) partielle, (b) complète et (c) uniforme.

Pour chaque mobile, cette vitesse de rotation N_{js} a été déterminée expérimentalement dans la cuve de 20 L utilisée dans ce travail par le protocole suivant :

- 20 L de solution contenant une concentration de 9 g L^{-1} de Cytodex1TM ont été placés dans la cuve ;
- Le mobile d'agitation est ensuite mis en rotation à une vitesse élevée afin d'atteindre un état de suspension uniforme ;
- La vitesse de rotation du mobile est ensuite réduite à une valeur de consigne ;
- Le comportement des microporteurs au fond de la cuve est observé pendant 45 min grâce au miroir incliné à 45° situé sous la cuve ;
- Cette procédure est répétée jusqu'à obtenir la plus petite vitesse de rotation du mobile pour laquelle aucun microporteur ne reste posé sur le fond de la cuve plus de 2 ou 3 s.

Cette vitesse N_{js} est déterminée pour chaque mobile avec une précision de 1 rpm.

2.3 Dispositif 2D P.I.V.

La vélocimétrie par image de particules, communément appelée P.I.V. (Particle Image Velocimetry), est une méthode optique non intrusive permettant d'obtenir des cartes de vitesse instantanée dans un plan de l'écoulement étudié. Le schéma de principe de la technique 2D P.I.V. est illustré à la Figure II-13.

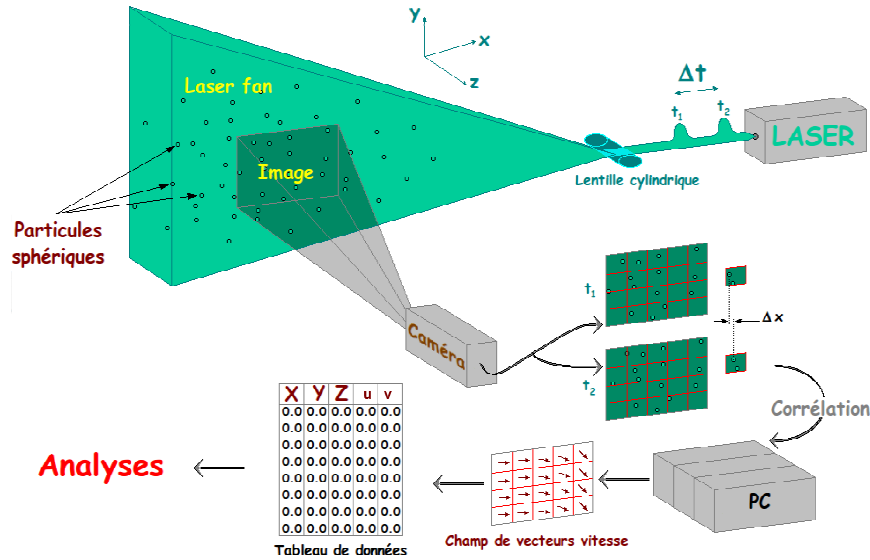


Figure II-13 : Schéma de principe de la technique 2D P.I.V.

Pour obtenir ces champs instantanés de vitesse, le fluide est initialementensemencé par des particules de traceur, qui sont de petites particules fluorescentes dont la densité est la plus proche possible de celle du fluide, de manière à ce qu'elles suivent l'écoulement de ce dernier. Une source laser pulsée, dont la longueur d'onde est susceptible d'exciter les particules, génère deux impulsions lumineuses décalées dans le temps d'un intervalle Δt programmable. Ces impulsions traversent un dispositif optique qui transforme le faisceau en un plan lumineux. Les particules présentes dans ce plan sont ainsi éclairées à deux instants différents.

Une caméra CCD, dont l'axe optique est perpendiculaire au plan lumineux, enregistre les positions des particules pour chaque impulsion lumineuse. Ces positions sont enregistrées sur des clichés différents. Le premier cliché contient donc la position initiale des particules au temps t , tandis que le second cliché contient la position finale des particules au temps $t + \Delta t$. Vu le très grand nombre de particules par cliché ($\sim 50\,000$) et leur ressemblance, il n'est pas possible d'identifier les positions initiales et finales de chacune des particules et de déterminer leur vitesse par un calcul du type distance parcourue divisée par l'intervalle de temps. C'est pourquoi le champ instantané de vitesse est déterminé par une méthode probabiliste de corrélation croisée. Pour appliquer cette méthode, les images acquises par les caméras sont divisées en zones, par exemple de 32×32 pixels². Le déplacement moyen, D_{moyen} de plusieurs particules comprises dans ces petites zones est déterminé par un traitement de signal en transformée de Fourier. La vitesse moyenne des particules dans chaque zone est obtenue par une relation du type:

$$\vec{V}_{zone} = \frac{1}{M} \frac{D_{moyen}}{\Delta t} \quad (II-1)$$

où M est le facteur d'échelle permettant de convertir en mètres les distances exprimées en pixels dans les images.

Une explication sur le principe de la corrélation croisée ainsi que le détail des traitements appliqués sur les images brutes acquises par la caméra CCD pour obtenir les champs instantanés de vitesse sont placés à l'Annexe II-1 de ce chapitre.

Le dispositif 2D P.I.V. utilisé dans ce travail est commercialisé par la société Dantec Dynamics S.A. (Danemark) (Figure II-14a). Ses principaux composants sont :

- Un laser Nd-Yag (Figure II-14b) à double cavité d'une puissance de 2×30 MJ qui produit un faisceau d'une longueur d'onde de 532 nm. Ce laser est le modèle Solo II-30 de la marque New Wave Gemini. Il est monté sur un rail coulissant permettant son positionnement. Il pulse à une fréquence de 4 Hz. Le faisceau laser est transformé en un plan à l'aide d'une lentille cylindrique. L'épaisseur du plan laser est de l'ordre de 3 mm;
- Une caméra Hi/Sense fournie par Dantec (Figure II-14c). Il s'agit d'une caméra CCD (Charge Coupled Device) avec une résolution de 1280×1024 pixels², équipée d'un objectif AF Micro Nikkor 60 mm F 2.8D de la marque Nikon. L'axe optique de la caméra est aligné avec la normale du plan éclairé par le laser grâce à un dispositif de miroir et de pointeurs laser;
- Un processeur corrélateur en temps réel 2500 de la marque Dantec qui synchronise les pulses du laser et les acquisitions des couplets d'images par la caméra (Figure II-14d).
- Un logiciel de traitement des images développé et fourni par Dantec, appelé Flowmanager (version 4.00.27) ;
- Des particules de traceur en résine de polyamide d'un diamètre moyen compris entre 5 et 35 μm et d'une masse volumique égale à 1030 kg m^{-3} . Ces particules émettent un rayonnement aux longueurs d'onde correspondant à la lumière visible.

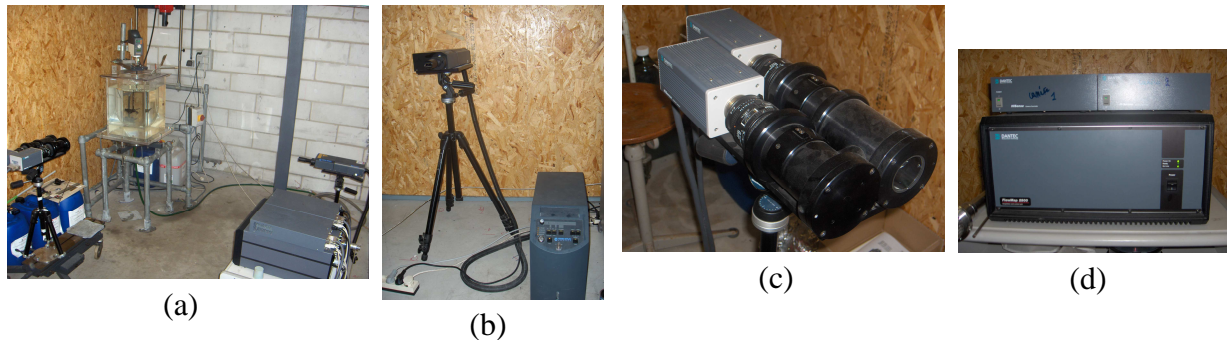


Figure II-14 : (a) Dispositif 2D P.I.V, (b) Laser Nd-Yag, (c) Caméra Hi-Sense, (d) Processeur Corrélateur.

Le dispositif P.I.V. est employé dans cette étude pour caractériser les champs instantanés de vitesse et les champs moyens de vitesse générés par les sept mobiles d'agitation décrits dans la section précédente. Pour chaque mobile, les mesures sont réalisées à six vitesses de rotation : N_{js} , 50 rpm, 67.5 rpm, 85 rpm, 102.5 rpm et 120 rpm. Pour chaque condition, le champ moyen de vitesse est obtenu par la moyenne de 250 champs instantanés de vitesse. Comme expliqué dans le Chapitre I, le fluide modèle utilisé lors de ces campagnes de mesures P.I.V. est l'eau car il présente l'avantage d'être transparent et d'avoir la même viscosité que le milieu de culture.

Comme mentionné ci-dessus, l'ensemble des traitements appliqués sur les images brutes et la manière dont nous avons fixé les paramètres de ces traitements sont détaillés dans l'Annexe II-1. Cependant nous attirons l'attention des lecteurs sur le choix de la taille de la fenêtre d'interrogation (ici 32×32 pixels²), dans laquelle le déplacement moyen des particules est

calculé par transformée de Fourier. Ce choix est loin d'être anodin. En effet, il définit la résolution spatiale des mesures car seules les structures de l'écoulement turbulent dont la taille est égale ou supérieure à celle des fenêtres d'interrogation peuvent être étudiées par P.I.V. Cette résolution est d'autant meilleure que la taille des fenêtres d'interrogation exprimée en mm est petite. Pour réduire cette taille, on peut, d'une part, réduire le nombre de pixels par fenêtre d'interrogation (32×32 pixels² ou 16×16 pixels², ...) et, d'autre part, diminuer la taille physique d'un pixel. Pour une caméra possédant une résolution fixée, la taille du pixel est d'autant plus petite que les dimensions (exprimés en m) de la zone de l'écoulement vue par la caméra sont faibles. Ainsi, pour améliorer la résolution spatiale des mesures 2D P.I.V., seule la moitié droite de la cuve est étudiée. L'étude de l'écoulement sur l'ensemble de la hauteur de la cuve est réalisée en deux étapes, la caméra observant successivement la partie inférieure (cadre bleu) et la partie supérieure (cadre rouge) telles que représentées sur la Figure II-15. L'étude de l'écoulement dans l'ensemble de la cuve est basée sur l'hypothèse que l'écoulement est axisymétrique autour de l'axe de rotation du mobile. Ayant choisi des fenêtres d'interrogation de 32×32 pixels², la résolution spatiale des mesures 2D P.I.V. vaut 2.6 mm. Cette valeur correspond à la distance entre deux vecteurs de vitesse voisins.

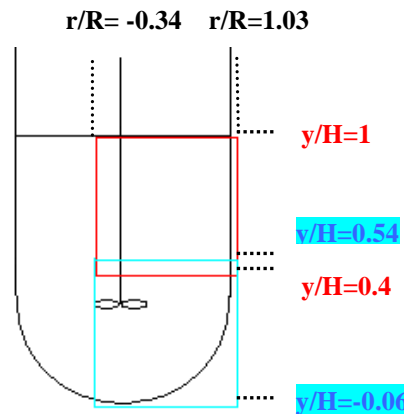


Figure II-15 : Zone inférieure (cadre bleu) et zone supérieure (cadre rouge) de la cuve successivement observées par la caméra lors des mesures 2D P.I.V.

2.4 Puissance globale dissipée

Le moteur Heidolph (RZR 2102 Control, 100 W) est équipé d'un dispositif permettant de mesurer le couple exercé sur l'axe d'agitation lors de sa rotation. Ce couple doit vaincre l'inertie du fluide qui s'oppose à sa mise en mouvement. Il est donc lié à la puissance que doit fournir le mobile pour mettre et maintenir le fluide en mouvement. Cette puissance sera *in fine* dissipée par frottement visqueux sous forme de chaleur au sein de l'écoulement, ce qui explique la terminologie « puissance dissipée ». Lors des mesures de couple, la contribution des frottements internes du moteur n'est pas négligeable. Une procédure de calibration est donc nécessaire pour l'évaluer et la soustraire. Cette procédure comporte les étapes suivantes :



Figure II-16 : Panneau de contrôle du moteur Heidolph RZR 2102.

- 1) L'axe de rotation du mobile est retiré du mandrin du moteur ;
- 2) Le moteur est mis en fonctionnement à la vitesse de rotation souhaitée. Un bouton « calibration » permet de mettre « à zéro » la valeur affichée du couple. Le moteur est mis à l'arrêt ;
- 3) L'axe de rotation du mobile est remis dans le mandrin du moteur ;
- 4) Le moteur est mis à la vitesse de rotation souhaitée. La mesure du couple s'affiche sur son panneau de contrôle.

Notons que *via* ce mode opératoire, le couple mesuré comporte deux composantes :

- Le couple T' provenant de la résistance du fluide à se mettre en mouvement et qui est la composante que nous souhaitons mesurer ;
- Le couple dû à l'inertie de l'axe de l'agitation et du mobile.

Pour estimer cette deuxième composante du couple, le même mode opératoire a été répété en plaçant le mobile dans l'air. Il est apparu que cette composante du couple était négligeable, ce qui peut s'expliquer par la petite taille des mobiles d'agitation et de l'axe d'agitation.

À partir de la mesure du couple T' après calibration, la puissance dissipée est estimée par :

$$P = N' T' \quad (II-2)$$

où N' représente la vitesse de rotation du mobile exprimée en rad s^{-1} .

La puissance dissipée peut être reliée aux conditions opératoires par la relation :

$$P = \rho_l N_p N^3 d^5 \quad (II-3)$$

où ρ_l est la densité du fluide, N la vitesse de rotation du mobile, d son diamètre. N_p est le nombre de puissance du mobile. Il s'agit d'un nombre constant lorsque l'écoulement est turbulent et dont la valeur est fonction du mobile et de sa position dans la cuve.

La précision sur le couple mesuré au niveau du moteur est d'autant meilleure que la vitesse de rotation du mobile est élevée. Or, les vitesses de rotation étudiées dans ce chapitre sont relativement faibles. Il y a donc un risque important d'erreur sur l'estimation de P à partir de la Relation II-2. Pour réduire cette erreur, les valeurs de P présentées dans ce chapitre sont calculées à partir de la Relation II-3 où N_p est déduit des mesures de la puissance dissipée à des vitesses de rotation élevées.

2.5 Caractérisation des contraintes mécaniques

Le but du présent chapitre est de classer les mobiles sur base des contraintes mécaniques qu'ils génèrent au sein de l'écoulement lorsqu'ils tournent à leur vitesse de rotation N_{js} respective ou à un facteur multiplicatif de celle-ci $\times N_{js}$. Des outils doivent donc être définis pour caractériser et quantifier ces contraintes mécaniques. Dans le Chapitre I, les deux principales sources de stress hydrodynamique ont été mises en évidence. Il s'agit :

- Des contraintes de cisaillement générées par des tourbillons dont la taille est égale ou inférieure aux microporteurs. La présence de cette source de stress hydrodynamique peut être évaluée en comparant au diamètre des microporteurs la taille des plus petits tourbillons présents au sein de l'écoulement (l'échelle de Kolmogorov λ_K) ;
- Des contraintes mécaniques résultant des collisions entre microporteurs. L'intensité de ce stress hydrodynamique peut être évaluée par la grandeur TCS définie par Cherry et Papoutsakis (1987) et donc l'expression dépend du mécanisme d'interaction choisi. Pour rappel, le mécanisme TCS_{eddies} sera choisi si l'échelle de Kolmogorov est du même ordre de grandeur que la taille des microporteurs tandis que le mécanisme TCS_{shear} sera choisi si elle est nettement plus grande.

Ces grandeurs, introduites au Chapitre I, dépendent toutes du taux de dissipation de l'énergie cinétique turbulente ε via les relations :

$$\lambda_K = \left(\frac{\nu^3}{\varepsilon} \right)^{1/4} \quad (II-4)$$

$$TCS_{eddies} = \nu_{br}^3 \left(\frac{\pi^2 \rho_p d_p^2 \alpha}{72} \right) = (\varepsilon \nu)^{3/4} \left(\frac{\pi^2 \rho_p d_p^2 \alpha}{72} \right) \quad (II-5)$$

$$TCS_{shear} = \nu_{br}^3 \left(\frac{\pi^2 \rho_p d_p^2 \alpha}{72} \right) = \left(\left(\frac{\varepsilon}{\nu} \right)^{1/2} d_p \right)^3 \left(\frac{\pi^2 \rho_p d_p^2 \alpha}{72} \right) \quad (II-6)$$

Il faut donc être en mesure d'estimer ε . Théoriquement, la distribution des valeurs locales de ε pourrait être calculée à partir des champs de fluctuation de vitesse via la relation :

$$\varepsilon = \nu \left\{ \begin{aligned} & 2 \left(\overline{\left(\frac{\partial u'_x}{\partial x} \right)^2} + \overline{\left(\frac{\partial u'_y}{\partial x} \right)^2} + \overline{\left(\frac{\partial u'_z}{\partial x} \right)^2} + \overline{\left(\frac{\partial u'_x}{\partial y} \right)^2} + 2 \overline{\left(\frac{\partial u'_y}{\partial y} \right)^2} \right. \\ & + \overline{\left(\frac{\partial u'_z}{\partial y} \right)^2} + \overline{\left(\frac{\partial u'_x}{\partial z} \right)^2} + \overline{\left(\frac{\partial u'_y}{\partial z} \right)^2} + 2 \overline{\left(\frac{\partial u'_z}{\partial z} \right)^2} \\ & \left. + 2 \left(\overline{\left(\frac{\partial u'_x}{\partial y} \right) \left(\frac{\partial u'_y}{\partial x} \right)} + \overline{\left(\frac{\partial u'_x}{\partial z} \right) \left(\frac{\partial u'_z}{\partial x} \right)} + \overline{\left(\frac{\partial u'_y}{\partial z} \right) \left(\frac{\partial u'_z}{\partial y} \right)} \right) \right\} \quad (II-7) \end{aligned} \right.$$

Cependant, l'application de cette formule ne fournit une estimation fiable de ε que si la résolution spatiale des mesures P.I.V. est inférieure ou égale à l'échelle de Kolmogorov. Or, cette dernière est de l'ordre de quelques dizaines voire une centaine de μm . L'obtention d'une résolution spatiale de quelques dizaines de μm au niveau des champs de vitesse mesurés avec une caméra munie d'un capteur de 1024×1280 pixels² implique que la zone observée par la caméra soit très petite (environ 2 cm²). Dès lors, la détermination de ε dans l'ensemble du demi plan axial éclairé par le laser et compris entre la paroi de la cuve et l'axe de rotation du mobile (environ 400 cm²) nécessiterait de découper la zone étudiée en 200 petites zones, ce qui n'est pas envisageable.

Par ailleurs, une valeur moyenne du taux de dissipation de l'énergie cinétique turbulente dans l'ensemble de la cuve peut être estimée à partir de la puissance globale dissipée au sein de l'écoulement par :

$$\varepsilon_{moyen} = \frac{P}{\rho_l V} = \frac{N_p N^3 d^5}{V} \quad (II-8)$$

Cependant, cette valeur correspond à une valeur moyennée sur l'ensemble du volume de la cuve. Or, il a été clairement mis en évidence au Chapitre I que le taux de dissipation de l'énergie cinétique turbulente n'est pas réparti de manière homogène dans la cuve. Il est nettement plus intense dans la zone balayée par le mobile. Pour estimer une valeur plus proche des valeurs rencontrées dans cette zone, il faut diviser la puissance dissipée, non pas par le volume totale de la cuve V , mais par le volume balayée par le mobile V_{swept} :

$$\varepsilon_{max} = \frac{P}{\rho_l V_{swept}} = \frac{P}{\rho_l \left(\pi \left(\frac{d}{2} \right)^2 W \right)} = \frac{4 N_p N^3 d^3}{\pi W} \quad (II-9)$$

Ainsi, les valeurs de l'échelle de Kolmogorov λ_K et de TCS sont estimées par les Relations II-4 à II-6 dans lesquelles ε est successivement estimé par la Relation II-8 et II-9.

3 Résultats

3.1 Comparaison des sept mobiles à leur vitesse de rotation respective N_{js}

Dans cette section, les sept mobiles étudiés sont comparés sur base de l'écoulement moyen et sur base des contraintes mécaniques qu'ils génèrent au sein de la phase liquide lorsqu'ils tournent à leur vitesse de rotation minimale de maintien en suspension complète des microporteurs N_{js} . La comparaison est réalisée à cette vitesse de rotation bien spécifique car elle est une grandeur caractéristique du procédé. Pour obtenir la valeur de N_{js} pour chaque mobile, la procédure décrite au Point 2.2 a été appliquée. La caractérisation de l'écoulement moyen est réalisée par l'analyse des mesures P.I.V. tandis que la quantification des contraintes mécaniques est obtenue à partir de la mesure de la puissance globale dissipée et par l'application des Formules II-4 à II-9. L'analyse des résultats présentés dans cette section est basée sur les valeurs présentées au Tableau II-4 et au Tableau II-5.

Les mobiles n'ont pas tous la même capacité de maintien en suspension des microporteurs car la vitesse N_{js} (colonne 2, Tableau II-4) varie fortement d'un mobile à l'autre. Les mobiles peuvent être classés en trois catégories. La première catégorie contient le mobile EE 150 qui présente d'excellentes performances car il parvient à mettre les microporteurs en suspension complète à partir d'une vitesse de 20 rpm. La deuxième catégorie regroupe les mobiles A310 156, TTP 125, 3SB 160 et A315 125 car ils présentent tous des valeurs de N_{js} similaires, comprises entre 49 et 54 rpm. La dernière catégorie contient les mobiles TTP 150 et A315 150 qui présentent des performances intermédiaires entre les deux précédentes catégories. En effet, ils maintiennent les microporteurs en suspension complète à partir de

vitesse de rotation deux fois plus élevées que le mobile EE 150 (40 rpm et 38 rpm, respectivement) mais 20% plus faibles que les mobiles de la deuxième catégorie.

Tableau II-4 : Présentation pour chaque mobile de sa vitesse de rotation minimale de maintien des microporteurs en suspension complète N_{js} , de la constante S de la corrélation de Zwietering, du nombre de Reynolds de l'écoulement à la vitesse de rotation N_{js} , de la moyenne et du percentile 90 de la distribution numérique du champ moyen de vitesse à la vitesse de rotation N_{js} et du nombre de puissance du mobile.

Mobile	N_{js} (rpm)	S (-)	Re (-)	V_{moyen} (m s ⁻¹)	$V_{90\%}$ (m s ⁻¹)	N_p (-)
EE 150	20	1.62	7 350	0.025	0.05	2.14
A315 150	38	3.07	13 965	0.029	0.055	0.90
TTP 150	40	3.23	14 700	0.030	0.055	0.46
A310 156	49	4.09	10 476	0.031	0.06	0.25
TTP 125	50	3.46	12 760	0.024	0.045	0.37
3SB 160	53	4.52	22 161	0.032	0.065	0.22
A315 125	54	3.74	13 781	0.030	0.06	0.58

La diversité de résultats obtenus alors que les propriétés physiques de la suspension ($\%_{solide}$, $\Delta\rho$, ν), sont constantes, indique que la valeur de N_{js} dépend fortement du design du mobile et de son implantation dans la cuve. Cette constatation est soutenue par diverses corrélations disponibles dans la littérature. Citons la plus connue qui est la corrélation de Zwietering (1958).

$$N_{js} = S d_p^{0.2} \nu^{0.1} g^{0.45} \Delta\rho^{0.45} \%_{solide}^{0.13} \rho_l^{-0.45} d^{-0.85} \quad (II-10)$$

Pour élaborer cette corrélation, Zwietering a réalisé un panel d'expériences dans diverses géométries de cuve, avec différents types de mobiles et en faisant varier les propriétés physiques de la suspension. Il a constaté que deux catégories de grandeur apparaissent dans sa corrélation :

- La première catégorie regroupent des variables associées aux caractéristiques physiques de la suspension (d_p , ν , g , $\%_{solide}$, $\Delta\rho$, ρ_l). Il a observé que les exposants apparaissant sur ces grandeurs dans la corrélation sont totalement indépendants du type de mobile et de la géométrie de la cuve ;
- La seconde catégorie regroupe des grandeurs liées à la géométrie de la cuve (d , T , d/T , W/T , Y/T) et au design du mobile. Leur effet sur N_{js} est également totalement décorrélés des propriétés physiques de la suspension.

Dans la corrélation de Zwietering et dans d'autres corrélations disponibles dans la littérature telles que, par exemple, celle de Raghava Rao *et al.*, (1988), les effets des grandeurs géométriques et des propriétés du mobile sur N_{js} ne sont pas clairement explicités. Ils sont regroupés dans la constante S . La valeur de cette constante et son évolution en fonction des paramètres T , Y/T , d/T et W/T ont été établies à l'aide de plans d'expériences pour des mobiles classiques tels que la turbine de Rushton ou la turbine à pales inclinées. Ce travail n'a pas été fait pour des mobiles commerciaux comme ceux utilisés dans cette thèse. Dès lors, la valeur de S est indéterminée pour ces mobiles et il n'est pas possible de prédire *a priori* leur valeur

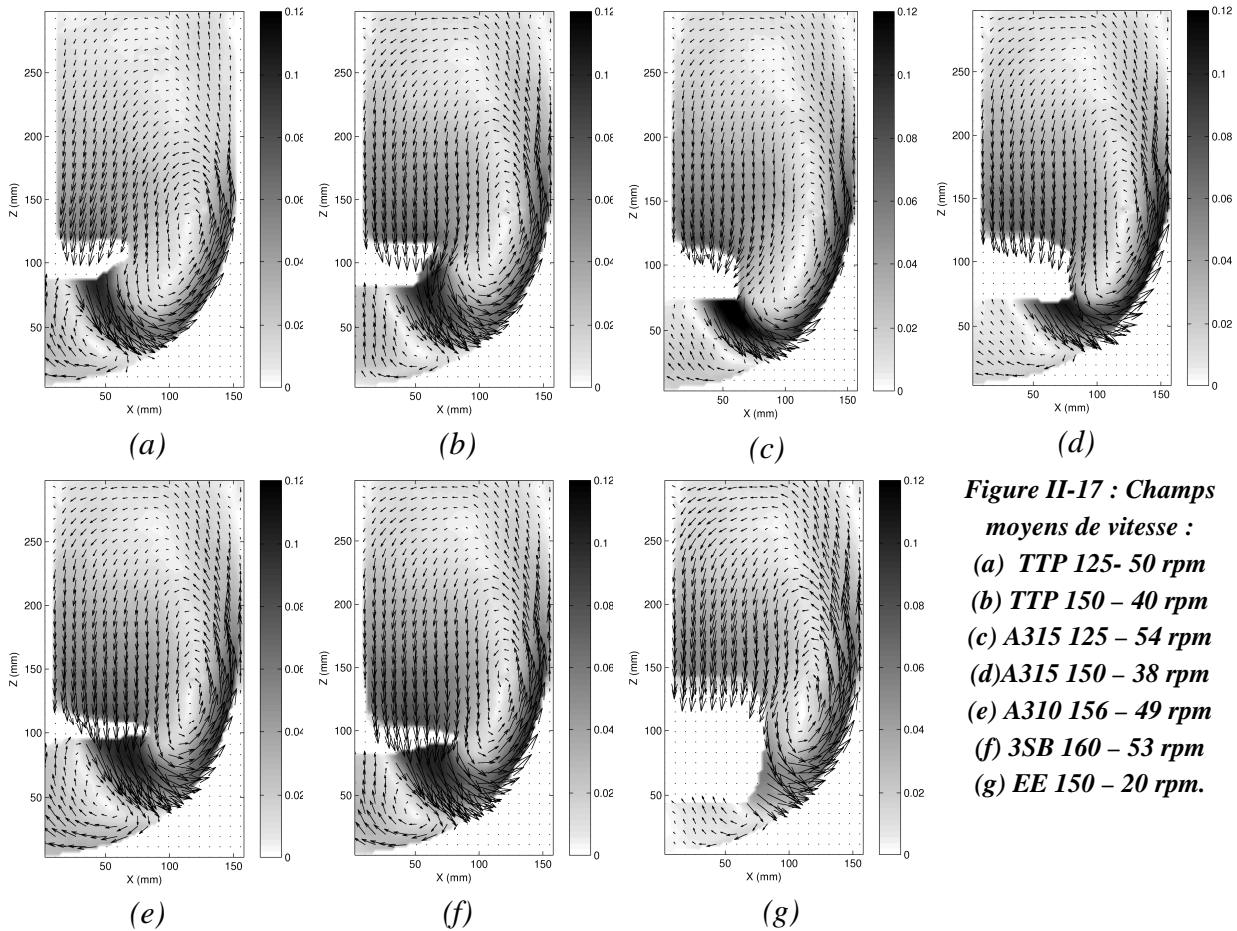
de N_{js} en employant une corrélation comme celle de Zwietering. *A posteriori*, par contre, la valeur de S de chaque mobile peut être calculée connaissant expérimentalement la valeur de N_{js} et les propriétés physiques de la suspension. Le résultat obtenu est présenté dans la colonne 3 du Tableau II-4. Les valeurs de S varient entre 1.62 pour le mobile EE 150 à 4.52 pour le mobile 3SB 160. Comme la valeur de S dépend fortement du design du mobile, il ne nous est pas possible de faire de nombreux commentaires sur les valeurs obtenues. Nous pouvons juste constater que la valeur de S pour un design de mobile donné (A315 ou TTP) et une valeur constante de Y/T diminue lorsque les *ratio* d/T et W/T augmentent. Ces résultats sont en accord avec les travaux de Raghava Rao *et al.* (1988) réalisés sur des turbines à pales inclinées. Les auteurs concluaient que des particules solides sont d'autant plus facilement mises en suspension (*i.e.* faible N_{js}) lorsque le jet de liquide à la sortie des pales du mobile est large (*i.e.* d/T grand) et proche du fond de la cuve (*i.e.* soit un Y/T petit ou soit un W/T grand pour un Y/T constant).

Toutes les grandeurs présentées au Chapitre I et dans les sections précédentes du Chapitre II sont basées sur des relations valables uniquement si l'écoulement dans la cuve est pleinement turbulent. Or, les valeurs de N_{js} déterminées expérimentalement sont relativement faibles. Il pourrait donc y avoir un doute sur le caractère pleinement turbulent de l'écoulement au sein de la cuve. Heureusement, les valeurs du nombre de Reynolds, présentées dans la colonne 4 du Tableau II-4, semblent confirmer le caractère turbulent de l'écoulement puisqu'elles sont nettement supérieures à 1000. De plus et comme cela a été rappelé au Chapitre I, une propriété particulière de l'écoulement turbulent est l'invariance des profils de vitesse avec la vitesse de rotation lorsque ces profils sont normés par la vitesse en bout de pale. Cette propriété a été vérifiée grâce aux mesures P.I.V. acquises aux diverses vitesses de rotation. Afin de ne pas diluer l'information présentée dans ce chapitre, cette étude est reprise en Annexe II -2. Dans cette étude, on montre également que les nombres de puissance N_p et de pompage N_{Qp} de chacun des mobiles sont indépendants de la vitesse de rotation dans la gamme de vitesse testée. Ces deux invariances sont également des caractéristiques typiques de l'écoulement pleinement turbulent.

Une fois les valeurs de N_{js} déterminées, les mobiles peuvent être comparés sur base de l'écoulement moyen et du stress hydrodynamique qu'ils génèrent au sein de la phase liquide dans ces conditions.

La Figure II-17 montre les champs moyens de vitesse mesurés par P.I.V. pour chaque mobile utilisé à sa vitesse de rotation N_{js} . L'intensité du niveau de gris indique l'intensité de la vitesse correspondant à l'écoulement moyen tandis que les flèches indiquent la direction de l'écoulement. Comme indiqué précédemment, seule la moitié droite de l'écoulement a été mesuré par P.I.V.. Les champs moyens de vitesse présentés ci-dessous sont donc bordés à droite par la paroi de la cuve et à gauche par l'axe de rotation du mobile. Un masque a été appliqué sur la zone balayé par les pales du mobile car ces dernières génèrent des artefacts dans les images acquises par la caméra introduisant ainsi des erreurs importantes dans les mesures P.I.V..

L'analyse de la structure de l'écoulement moyen montre que les mobiles génèrent des écoulements moyens similaires lorsqu'ils tournent à leur vitesse de rotation N_{js} respective. Tous les mobiles présentent des écoulements moyens composés de deux boucles de recirculation et la gamme de variation de la vitesse locale dans ces champs moyens est comprise entre 0 et 0.1 m s^{-1} .



La moyenne et le percentile 90 des champs moyens de vitesse sont présentés, pour chaque mobile, dans les colonnes 4 et 5 du Tableau II-4. Ces valeurs sont extrêmement proches les unes des autres et elles confirment donc la similitude existant entre les écoulements moyens générés par les mobiles utilisés à leur vitesse N_{js} respective. Diverses études disponibles dans la littérature semblent appuyer ce constat. Par exemple, Bao *et al.* (2002) montrent que différents mobiles axiaux génèrent au fond d'une cuve carrée une même vitesse moyenne lorsqu'ils maintiennent juste en suspension des billes de verre. Isbrahim et Nienow (1996) mentionnent clairement dans leur étude que la suspension d'une phase solide dans une phase liquide semble en grande partie contrôlée par l'écoulement moyen généré par le mobile. Enfin, Nikhade et Pangarkar (2007) énoncent leur théorème des états hydrodynamiques correspondants sur base d'une étude analysant le coefficient de transfert entre une phase solide et une phase liquide en fonction de l'écoulement. Ce théorème dit « *Un même coefficient de transfert dans une cuve agitée est obtenu pour des géométries et des conditions opératoires différentes pour autant que la cuve fonctionne à un même ratio N/N_{js} et un même nombre de Schmidt. Ces deux dernières grandeurs définissent de manière univoque l'état*

hydrodynamique correspondant ». Cette étude conforte particulièrement bien les conclusions faites dans ce paragraphe, car le coefficient de transfert de matière atteint sa valeur maximale à partir de la vitesse de rotation N_{js} (Nikhade et Pangarkar, 2007).

Pour quantifier le stress hydrodynamique généré par chaque mobile, il est nécessaire de quantifier la puissance globale dissipée, P . Les vitesses de rotation correspondant à N_{js} étant petites, l'estimation de P par la mesure directe du couple serait entachée d'une grande erreur. La puissance globale dissipée P est donc calculée par la Relation II-3 où le nombre de puissance N_p a été déterminé par des mesures de couple à des vitesses de rotation plus élevées. Les valeurs du nombre de puissance sont présentées dans la dernière colonne du Tableau II-4. Elles sont en bon accord avec celles présentés dans la littérature. Pour des raisons de lisibilité, cette comparaison des valeurs mesurées et des valeurs issues de la littérature est reprise à l'Annexe II-3 de ce chapitre. Cette étude met également en évidence que le nombre de puissance d'un mobile dépend de sa position dans la cuve, de son diamètre et de la forme du fond de la cuve.

Tableau II-5 : Comparaison des mobiles sur base des contraintes mécaniques qu'ils génèrent à leur vitesse de rotation N_{js} respective.

Mobile	P (W)	$\lambda_{K,moyen}$ (μm)	$\frac{\lambda_{K,moyen}}{d_p}$ (-)	$\lambda_{K,min}$ (μm)	$\frac{\lambda_{K,min}}{d_p}$ (-)	TCS_e moyen (10^{-13} W)	TCS_e max (10^{-13} W)
EE 150	0.0060	240	0.96	129	0.52	1.30	53.38
A315 150	0.0174	184	0.74	82	0.33	6.35	801.45
TTP 150	0.0103	210	0.84	82	0.33	2.91	790.85
A310 156	0.0128	199	0.79	69	0.28	4.00	2332.11
TTP 125	0.0066	234	0.94	85	0.34	1.48	695.45
3SB 160	0.0162	187	0.75	65	0.26	5.74	3101.06
A315 125	0.0129	199	0.79	76	0.30	4.06	1288.90

La connaissance du nombre de puissance rend possible l'estimation de la puissance globale dissipée P , des valeurs du taux de dissipation de l'énergie turbulente ε_{moyen} , ε_{max} et du stress hydrodynamique correspondant. Les valeurs numériques de l'échelle de Kolmogorov et du TCS présentées au Tableau II-5 permettent de caractériser le stress hydrodynamique généré par chacun des mobiles tournant à sa vitesse de rotation N_{js} . Dans chaque cas, deux valeurs de l'échelle de Kolmogorov et du TCS sont présentées. Elles correspondent aux deux valeurs du taux de dissipation de l'énergie cinétique turbulente ε calculées par les Relations II-8 et II-9 et qui considèrent respectivement une valeur moyenne de ε dans l'ensemble du volume de la cuve ou une valeur plus proche de la valeur maximale présente dans la zone balayée par le mobile. Les valeurs de TCS sont calculées en utilisant la relation basée sur le modèle « eddies » (Equation II-5) puisque les valeurs des échelles de Kolmogorov moyenne et « maximale » sont du même ordre de grandeur que la taille des microporteurs.

Avant de classer les mobiles, comparons les valeurs du Tableau II-5 obtenues à la vitesse de rotation N_{js} aux valeurs seuils à partir desquelles des dommages cellulaires sont observés d'après la littérature scientifique. Les valeurs du Tableau II-5 correspondent au niveau minimal de stress hydrodynamique qui peut être rencontré dans un bioréacteur en fonctionnement car si on souhaite maximiser la surface solide disponible pour le développement cellulaire, il n'est pas possible de le faire fonctionner à une vitesse de rotation inférieure à N_{js} . Cherry et Papoutsakis (1988) ont rapporté une augmentation de la vitesse de mort cellulaire de cellules de fibroblaste humain lorsque le rapport entre l'échelle de Kolmogorov et le diamètre des microporteurs est inférieur à environ 0.5 (Figure II-18). Croughan *et al.* (1989) ont observé un phénomène similaire sur des cellules de rein d'embryon bovin lorsque la valeur de TCS dépasse 5×10^{-13} W (Figure II-19). Les valeurs présentées dans les colonnes 4 et 7 du Tableau II-5, qui sont calculées en supposant que la puissance mécanique se dissipe de manière uniforme dans l'ensemble du volume de la cuve, semblent indiquer que le stress hydrodynamique n'est pas néfaste pour les cellules animales puisque les valeurs obtenues sont en dessous des seuils. Par contre, les valeurs présentées dans les colonnes 6 et 8 calculées en supposant que la puissance mécanique se dissipe uniquement dans le volume balayé par le mobile montrent qu'il existe un risque de stress hydrodynamique néfaste dans cette zone puisque les valeurs seuils sont dépassées. Cependant, ce n'est pas tout à fait correct car seule une fraction de la puissance globale, de l'ordre de 40%, se dissipe dans la zone balayée par le mobile (Khan *et al.*, 2006). Néanmoins, même si on applique un facteur correctif sur les valeurs de ε_{max} calculées, on conserve des valeurs de l'échelle de Kolmogorov et du TCS du même ordre de grandeur que celles présentées dans les colonnes 6 et 8 du Tableau II-5, c'est-à-dire au-delà des valeurs seuils. L'ensemble de ces résultats indiquent donc que si les mobiles testés tournent à leur vitesse de rotation minimale N_{js} , globalement dans l'ensemble de l'écoulement le stress hydrodynamique n'atteint pas un niveau néfaste sauf dans une zone limitée autour du mobile d'agitation.

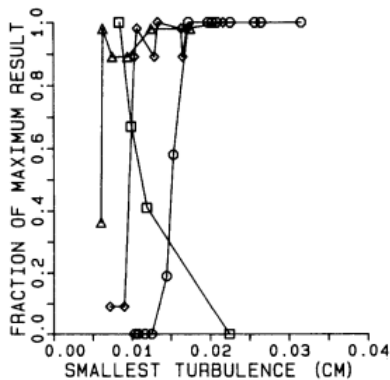


Figure II-18 : Évolution de la vitesse spécifique de mort (\square), de la croissance (\circ), de la population maximale (\diamond) après 24 h (Δ) en fonction de la taille de l'échelle de Kolmogorov.

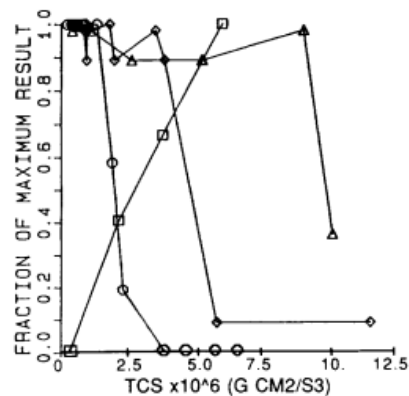


Figure II-19 : Évolution de la vitesse spécifique de mort (\square), de la croissance (\circ), de la population maximale (\diamond) après 24 h (Δ) en fonction de la valeur de TCS.

Les valeurs présentées dans le Tableau II-5 permettent aussi de classer les mobiles en fonction du niveau de stress hydrodynamique généré lorsqu'ils tournent respectivement à leur vitesse de rotation N_{js} . Le stress hydrodynamique est d'autant plus intense que la taille de l'échelle

de Kolmogorov est petite par rapport aux microporteurs et que la valeur de TCS est grande. Le classement obtenu va dépendre de la manière d'estimer le taux de dissipation de l'énergie cinétique turbulente, ε :

Si $\varepsilon_{moyen} = P / \rho_l V$ (Relation II-8), on obtient, par ordre croissant de stress :

EE 150 < TTP 125 < TTP 150 < A310 156 < A315 125 < 3SB 160 < A315 150

Si par contre $\varepsilon_{max} = P / \rho_l V_{swept}$ (Relation II-9), on obtient, par ordre croissant de stress :

EE 150 < TTP 125 < TTP 150 < A315 150 < A315 125 < A310 156 < 3SB 160

Cette différence entre les classements est due au fait que, dans le premier cas, le volume considéré pour la dissipation de la puissance est le même pour tous les mobiles, égal au volume de la cuve, tandis que dans le second cas, le volume considéré est égal au volume balayé par le mobile qui dépend de sa taille et son design. Cependant, les deux mêmes mobiles arrivent en tête des deux classements. Il s'agit des mobiles EE 150 et TTP 125. La différence entre ces deux mobiles et les cinq autres est surtout significative lorsque le stress hydrodynamique est évalué sur base des grandeurs calculées sur l'ensemble de la cuve. En effet, les valeurs obtenues pour l'échelle de Kolmogorov sont au minimum 10% plus élevées que celles obtenues pour les autres mobiles et celles obtenues pour le TCS_{eddies} sont au moins deux fois plus faibles. Lorsque le stress hydrodynamique est calculé sur base de la puissance dissipée dans la zone balayée par le mobile, c'est surtout le mobile EE 150 qui se différencie des autres. Les valeurs relatives au mobile TTP 125, restent plus favorables que celles des mobiles TTP 150 et A315 150, mais elles s'en rapprochent. Ceci est dû à la différence de volume balayé par le mobile. Dans le cas des mobiles EE 150, TTP 150 et A315 150, le volume balayé est grand et la puissance dissipée est donc divisée par une valeur élevée pour calculer ε_{max} . Le volume balayé par le mobile TTP 125 étant nettement plus petit, la valeur utilisée pour normer la puissance est plus faible.

En conclusion à cette section, tous les mobiles sélectionnés ont une vitesse minimale de maintien en suspension complète des microporteurs relativement faible. Lorsqu'ils tournent chacun à la vitesse qui leur est propre, ils génèrent tous des écoulements moyens qui sont remarquablement similaires entre eux. Le classement des mobiles en fonction du stress hydrodynamique qu'ils créent à leur vitesse de rotation N_{js} met en évidence la supériorité des mobiles EE 150 et TTP 125. En effet, ces deux mobiles sont caractérisés par les rapports

λ_k / d_p les plus élevées et les valeurs de TCS_{eddies} les plus faibles. Suivant que ces deux grandeurs sont estimées sur base d'une moyenne sur tout le volume de la cuve ou uniquement sur le volume balayé par le mobile, le stress hydrodynamique est inférieur ou supérieur aux valeurs seuils annoncées dans la littérature. On peut donc en conclure que le stress hydrodynamique ne devrait pas être critique dans l'ensemble de l'écoulement, sauf dans la zone balayée par le mobile.

Cette analyse montre à quel point la définition du design d'un bioréacteur pour la culture de cellules animales est une tâche délicate. En effet, même en choisissant des designs de mobile

a priori bien adaptés et en travaillant à la vitesse minimale de maintien en suspension complète des microporteurs, un stress hydrodynamique potentiel néfaste peut déjà apparaître dans une petite partie de l'écoulement.

L'évaluation du stress hydrodynamique local et sa comparaison aux seuils critiques relevés dans la littérature feront l'objet d'une analyse hydrodynamique approfondie dans le Chapitre III.

3.2 Comparaison des sept mobiles à des vitesses de rotation N correspondant à des facteurs multiplicatifs de N_{js}

Dans cette section, nous décrivons l'évolution de l'écoulement moyen et du stress hydrodynamique générés par les sept mobiles lorsque ces derniers tournent à des vitesses de rotations supérieures à la vitesse N_{js} . La détermination de ces évolutions est importante car, en pratique, il est possible que le bioréacteur fonctionne à une vitesse de rotation supérieure à N_{js} pour parvenir à maintenir en suspension complète des agrégats de microporteurs se formant en cours de culture suite à l'adhésion d'une même cellule sur plusieurs billes. Pour chaque mobile, ces vitesses de rotation sont exprimées comme des facteurs multiplicatifs de la vitesse minimale de maintien en suspension complète des microporteurs isolés, soit $x N_{js}$.

L'évolution de l'écoulement moyen avec cette vitesse de rotation $x N_{js}$ est strictement linéaire. En effet, dans la section précédente, nous avons montré que l'écoulement était turbulent. Il se caractérise donc par un écoulement moyen indépendant de la vitesse de rotation du mobile, si le champ moyen de vitesse est normé par la vitesse en bout de pale. Ainsi, si on considère un point de l'écoulement où la valeur adimensionnelle de vitesse est égale à a , la vitesse moyenne en ce point pour la vitesse de rotation N_{js} vaudra :

$$\|\overrightarrow{V_{N_{js}}}\| = a(\pi N_{js} d) \quad (II-11)$$

où le terme entre parenthèse correspond à la vitesse linéaire à l'extrémité de la pale.

Pour une vitesse de rotation $x N_{js}$, elle vaudra :

$$\|\overrightarrow{V_{x.N_{js}}}\| = a(\pi x N_{js} d) = x \|\overrightarrow{V_{N_{js}}}\| \quad (II-12)$$

Ce raisonnement est valable en tout point de l'écoulement. Ce dernier évolue donc bien linéairement. L'évolution linéaire de l'écoulement moyen en fonction de la vitesse de rotation du mobile $x N_{js}$ a été vérifiée expérimentalement à partir des mesures 2D P.I.V.. La Figure II-20 et la Figure II-21 présentent les résultats obtenus. Sur ces figures, chaque point correspond à la valeur moyenne (Figure II-20) ou au percentile 90 (Figure II-21) du champ moyen de vitesse mesuré par P.I.V.. Les points relatifs à un même mobile sont parfaitement alignés ce qui confirme l'évolution linéaire du champ moyen de vitesse. Numériquement, on observe que des valeurs approximativement doubles sont obtenues lorsque la vitesse de rotation passe de N_{js} à $2 N_{js}$.

Cette évolution linéaire du champ moyen de vitesse avec la vitesse de rotation a de fortes implications pour la sélection de la vitesse de rotation qui permet de maintenir en suspension complète un agrégat de microporteurs. En effet, dans la section précédente, nous avons montré que lorsque les mobiles tournent chacun à leur vitesse N_{js} , ils génèrent des

écoulements moyens remarquablement similaires du point de vue de leur structure et de la gamme de vitesse. Il semble dès lors logique de penser que pour maintenir en suspension complète un agrégat donné de microporteurs, il faudra sélectionner pour tous les mobiles une vitesse de rotation correspondant à un même facteur multiplicatif $\times N_{js}$ de leur vitesse N_{js} . Sur la Figure II-20 et la Figure II-21, les droites correspondant aux différents mobiles sont en effet très proches les unes des autres ce qui confirme le bien fondé de notre raisonnement. Elles ne sont pas parfaitement confondues à cause des masques qu'il faut appliquer sur la zone balayée par le mobile dans les mesures P.I.V.. Comme le montre la Figure II-17, la taille du masque à appliquer dépend de la taille du mobile et varie donc d'un mobile à l'autre. Or, c'est précisément dans la zone masquée que les vitesses sont les plus élevées. Leur non-prise en compte a forcément une certaine influence sur la moyenne et sur le percentile 90 du champ moyen de vitesse. Sur la Figure II-20 et la Figure II-21, on voit logiquement que les valeurs les plus élevées de la moyenne et du percentile 90 sont obtenues pour les masques les plus petits (3SB 156, A310 160), tandis que les valeurs les plus faibles sont obtenues pour les masques les plus grands (EE 150).

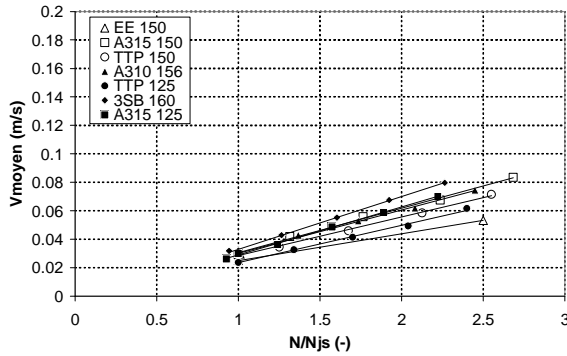


Figure II-20 : Évolution de la moyenne du champ moyen de vitesse en fonction de la vitesse de rotation du mobile exprimée comme un facteur multiplicatif de N_{js} .

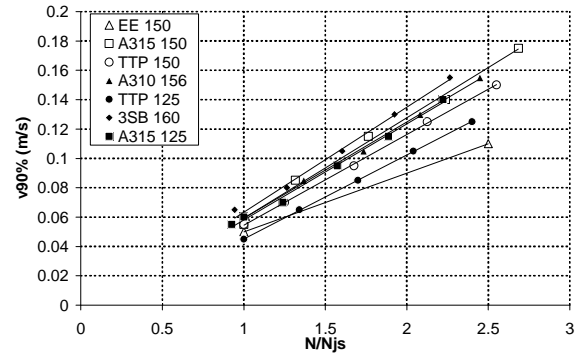


Figure II-21 : Évolution du percentile 90 du champ moyen de vitesse en fonction de la vitesse de rotation du mobile exprimée comme un facteur multiplicatif de N_{js} .

Pour tous les mobiles, l'évolution du stress hydrodynamique peut également être prédite par une relation mathématique s'il est évalué à partir des équations employées dans la section précédente. En effet, l'échelle de Kolmogorov et le TCS_{eddies} dépendent de ε , qui, s'il est estimé par les Relations II-8 et II-9, évolue comme le cube de la vitesse de rotation N_{js}^3 . Dès lors, la valeur de TCS_{eddies} (Relation II-6) évolue avec la vitesse de rotation $\times N_{js}$ selon une loi en $x^{9/4}$ et la taille de l'échelle de Kolmogorov (Relation II-4) évolue selon une loi $1/x^3$. Ainsi, comme attendu, le stress hydrodynamique associé à ces deux sources de contraintes mécaniques croît lorsque la vitesse de rotation du mobile augmente. Par contre, les classements des mobiles en fonction du stress hydrodynamique généré à la vitesse de rotation $\times N_{js}$ restent identiques à ceux obtenus à la vitesse de rotation N_{js} .

En conclusion à cette section, nous pouvons donc dire que pour maintenir un agrégat de microporteurs en suspension, il faudra sélectionner, pour chaque mobile, une vitesse de rotation correspondant à un même facteur multiplicatif \times de sa vitesse N_{js} . Puisque seule la vitesse de rotation est modifiée et qu'un même facteur multiplicatif \times est sélectionné, les

classements des mobiles en fonction du stress hydrodynamique généré à N_{js} restent valables ici. Les mobiles EE 150 et TTP 125 présentent donc les meilleures caractéristiques.

4 Conclusion

L'objectif de l'étude présentée dans ce chapitre est de proposer une méthode originale qui permet de sélectionner les mobiles axiaux les mieux adaptés à la culture de cellules animales sur microporteurs dans une cuve agitée de 20 L. Sept mobiles axiaux (A310 156, A315 125, A315 150, EE 150, 3SB 160, TTP 125, TTP 150) ont été présélectionnés sur base de leur design et des informations disponibles dans la littérature. Puisque deux critères importants de la culture de cellules sur microporteurs sont :

- Le maintien des microporteurs en suspension complète pour maximiser la surface disponible pour le développement cellulaire;
- La limitation des contraintes hydrodynamiques générées au sein de la phase liquide qui produisent un stress hydrodynamique sur les cellules,

les mobiles sont comparés dans cette étude sur base de l'écoulement moyen et du stress hydrodynamique qu'ils génèrent lorsqu'ils tournent à leur vitesse minimale respective de maintien en suspension complète des microporteurs N_{js} . Cette vitesse a été déterminée expérimentalement par l'étude visuelle du comportement de la suspension. Les mobiles ont également été comparés à des vitesses de rotation supérieures car des agrégats de microporteurs peuvent apparaître en cours de culture. Ces vitesses ont été exprimées comme des facteurs multiplicatifs de la vitesse N_{js} , soit $x N_{js}$.

La comparaison des écoulements moyens générés par les mobiles à N_{js} ou à $x N_{js}$ a été réalisée sur base des mesures 2D P.I.V. réalisées dans un plan vertical passant par l'axe central de la cuve et en supposant que l'écoulement est axisymétrique. Nous avons constaté que lorsque les mobiles tournent à leur vitesse N_{js} , les écoulements moyens qu'ils génèrent sont remarquablement similaires. Les écoulements étant turbulents, cette similarité est conservée pour des vitesses de rotation correspondant à des facteurs multiplicatifs de N_{js} . On peut donc penser que pour maintenir en suspension complète un agrégat donné de microporteurs, il faut sélectionner un même facteur multiplicatif x de N_{js} pour tous les mobiles.

Les mobiles sont classés par ordre croissant du stress hydrodynamique qu'ils génèrent. Ce stress est estimé sur base de la comparaison de l'échelle de Kolmogorov et de la taille des microporteurs et sur base de l'intensité des collisions entre microporteurs quantifiée par la valeur de la grandeur TCS_{eddies} . Pour calculer ces grandeurs, le taux de l'énergie cinétique turbulente ε a été estimé à partir de la puissance globale dissipée rapportée soit à l'ensemble du volume de la cuve, soit au volume balayé par le mobile. Ces deux méthodes de calcul permettent d'obtenir des valeurs moyennes de l'échelle de Kolmogorov et du TCS_{eddies} relatives à l'ensemble de la cuve et des valeurs plus proches des valeurs maximales présentes dans la zone proche du mobile.

Si ces valeurs moyennes et maximales sont comparées à des valeurs seuils à partir desquelles le stress hydrodynamique a un effet néfaste sur les cellules, on constate, qu'à la vitesse de

rotation N_{js} , le stress hydrodynamique ne devrait pas être problématique dans l'ensemble de l'écoulement, sauf dans la zone proche du mobile. Si on classe les mobiles en fonction du stress hydrodynamique qu'ils génèrent, on voit clairement que les mobiles EE 150 et TTP 125 génèrent les niveaux de stress hydrodynamique les plus faibles.

Cette nouvelle méthodologie a permis d'obtenir des conclusions originales.

En effet, Simmons *et al.* (2007) avaient déjà comparé le mobile EE à d'autres mobiles. Ils avaient conclu qu'aucun résultat n'indiquait que ce type de mobile générait des contraintes de cisaillement plus faibles. Leur comparaison étant réalisée à une même vitesse de rotation N pour tous les mobiles testés, ils n'ont pas tenu compte du fait que le mobile EE est caractérisé par une vitesse minimale de maintien en suspension complète des microporteurs nettement plus faible que les autres mobiles. Il peut donc être utilisé à des vitesses de rotation, N_{js} ou $x N_{js}$, plus faibles et les niveaux de stress hydrodynamique associés à ces faibles vitesses sont donc logiquement faibles aussi.

De plus, la comparaison des mobiles, non pas à même vitesse de rotation, mais sur base d'une variable liée au procédé (N_{js}), permet de montrer que des mobiles aux designs opposés et aux grandeurs intrinsèques (N_p , N_{js}) extrêmement différentes peuvent atteindre un même objectif, qu'est le maintien des microporteurs en suspension pour des contraintes mécaniques minimales.

L'étude présentée dans ce chapitre a cependant une limitation. Le stress hydrodynamique est caractérisé par des grandeurs globales, estimées sur base de la puissance globale dissipée. Il serait nettement plus intéressant de connaître la répartition spatiale de ce stress hydrodynamique au sein de l'écoulement. Pour accéder à cette distribution, il faut connaître la répartition spatiale du taux de dissipation de l'énergie cinétique turbulente ε , ce qui implique d'étudier la composante turbulente de l'écoulement. Cette étude est réalisée au Chapitre III grâce à des mesures 3D P.I.V. qui décrivent l'écoulement moyen et l'écoulement turbulent générés par les mobiles EE 150 et TTP 125. Cette étude établit des cartes de la répartition spatiale du stress hydrodynamique.

Annexe II-1 : Traitement appliqué sur les images brutes acquises par la caméra P.I.V. pour obtenir les champs instantanés de vitesse

Divers traitements doivent être appliqués sur les doublets d'images brutes acquises par la caméra pour en extraire les champs instantanés de vitesse validés. La première étape consiste à appliquer une corrélation croisée sur les doublets d'images. Pour ce faire, chaque image est divisée en petites fenêtres élémentaires carrées appelées aussi fenêtres ou zones d'interrogation dont la taille la plus courante est de 32 pixels de côté. D'autres valeurs comprises entre 16 et 64 pixels peuvent néanmoins être choisies. Grâce à une technique de corrélation croisée, le déplacement moyen le plus probable des particules présentes dans chaque fenêtre d'interrogation est déterminé. Le champ instantané de vitesse est ensuite obtenu en appliquant la formule suivante dans chaque fenêtre d'interrogation :

$$\vec{V}_{zone} = \frac{1}{M} \left(\frac{\vec{D}_{moyen}}{\Delta t} \right) \quad (II-13)$$

où \vec{D}_{moyen} est le déplacement moyen des particules dans la fenêtre d'interrogation pendant l'intervalle de temps Δt , et M est le facteur d'échelle entre la taille de l'objet sur l'image (exprimée en pixel) et sa taille réelle (exprimée en m). La technique de corrélation croisée repose sur le principe illustré à la Figure II-22.

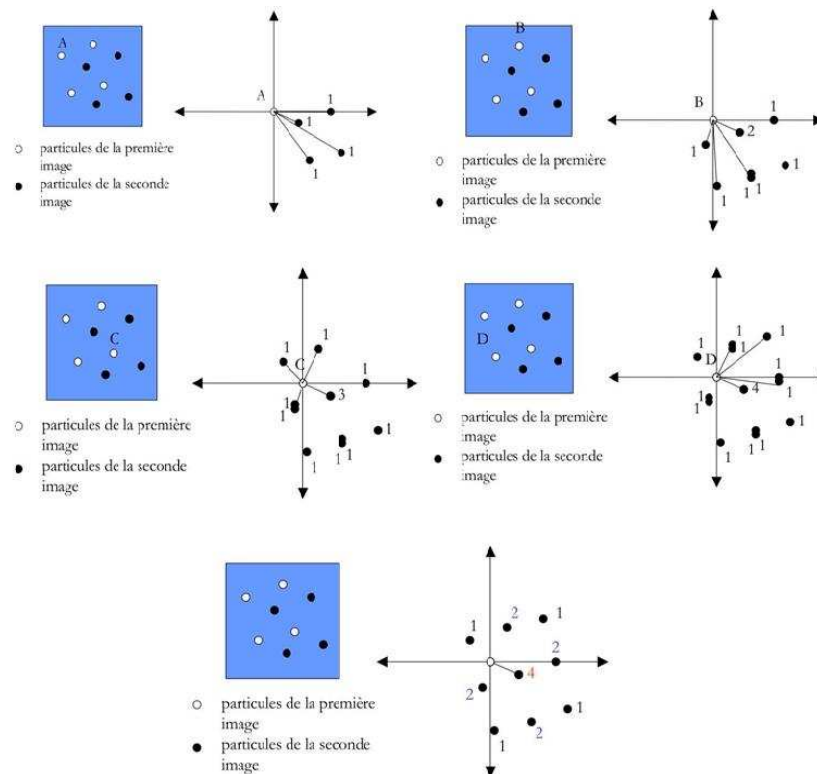


Figure II-22 : Principe de la corrélation croisée appliquée à une fenêtre d'interrogation.

Les positions initiales (en blanc) et finales (en noir) de 4 particules (A, B, C et D) sont représentées sur une même image. Grâce à l'interprétation de notre cerveau, le déplacement

des quatre particules entre les deux prises est évident. Un logiciel réalise la même analyse que notre cerveau. A droite de chaque image sont successivement tracés les déplacements possibles des particules A, B, C, D. Les chiffres notés à côté de ces déplacements indiquent si ces déplacements sont une solution pour une et une seule particule ou s'ils sont communs à plusieurs particules. Le déplacement commun au plus grand nombre de particules correspond au déplacement le plus probable des particules dans la fenêtre d'interrogation entre les deux clichés. Les autres déplacements correspondent au bruit de la mesure.

Mathématiquement, la fonction discrète de corrélation croisée ϕ_{fg} de la fenêtre d'interrogation $f(m,n)$ du premier cliché et $g(m,n)$ du second cliché est donnée par

$$\phi_{fg} = E[f(m,n), g(m,n)] \quad (II-14)$$

$$\phi_{fg} = \sum_{k=-\infty}^{k=+\infty} \sum_{l=-\infty}^{l=+\infty} f(k,l)g(k+m,l+n) \quad (II-15)$$

La valeur la plus élevée de la fonction de corrélation croisée représente donc la corrélation vraie tandis que les valeurs plus faibles correspondent à des corrélations aléatoires. Les résultats du traitement par corrélation croisée peuvent être représentés sur un graphique 3D (Figure II-23) où l'élévation correspond aux valeurs discrètes de la fonction de corrélation.

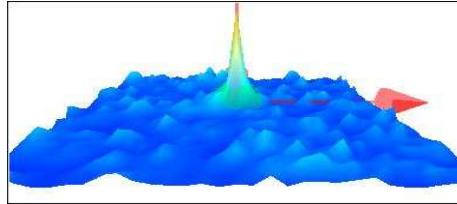


Figure II-23 : Plan de corrélation.

Ainsi, le pic de corrélation le plus intense correspond au meilleur couplage entre les fonctions $f(m,n)$ et $g(m,n)$. La position de ce pic dans le plan de corrélation correspond à la moyenne du déplacement de particules dans la fenêtre d'interrogation. En pratique, le calcul de la fonction de corrélation croisée est réalisé dans l'espace de Fourier pour accélérer les calculs de convolution.

La Figure II-24 illustre l'organigramme de traitement appliqué aux couples d'images brutes pour obtenir les champs instantanés de vitesse. Cet organigramme fait apparaître deux traitements optionnels dont nous n'avons pas encore parlé : « window function » et « filter function ». Le calcul de la fonction de corrélation par transformée de Fourier est basé sur l'hypothèse que le motif décrit par la position des particules est régulier. Cette hypothèse n'étant pas respectée en pratique, cela conduit à des particules fantômes et à des corrélations fantômes à la périphérie de la fenêtre d'interrogation. Ce problème est illustré à la Figure II-25. La « window function » permet d'éliminer ce problème en modifiant l'intensité lumineuse des pixels par un facteur variant entre 0 et 1 selon la position de ceux-ci dans la fenêtre d'interrogation. Puisqu'une partie de la fenêtre d'interrogation n'est plus prise en compte, il est conseillé de réaliser un « overlapping ». Cette opération est illustrée à la Figure II-26 pour un overlapping de 50% : les couplets d'images sont à nouveau divisés en fenêtres d'interrogation, mais le maillage est décalé de la moitié de la taille des cellules vers le bas et vers la droite par rapport à la découpe initiale. Ce recouvrement permet de récupérer l'information qui a été perdue lors de l'application de la « window function ». Enfin, la

« filter function » permet d'améliorer le résultat obtenu en atténuant le bruit provenant, par exemple, de la réflexion lumineuse sur les surfaces présentes dans le local.

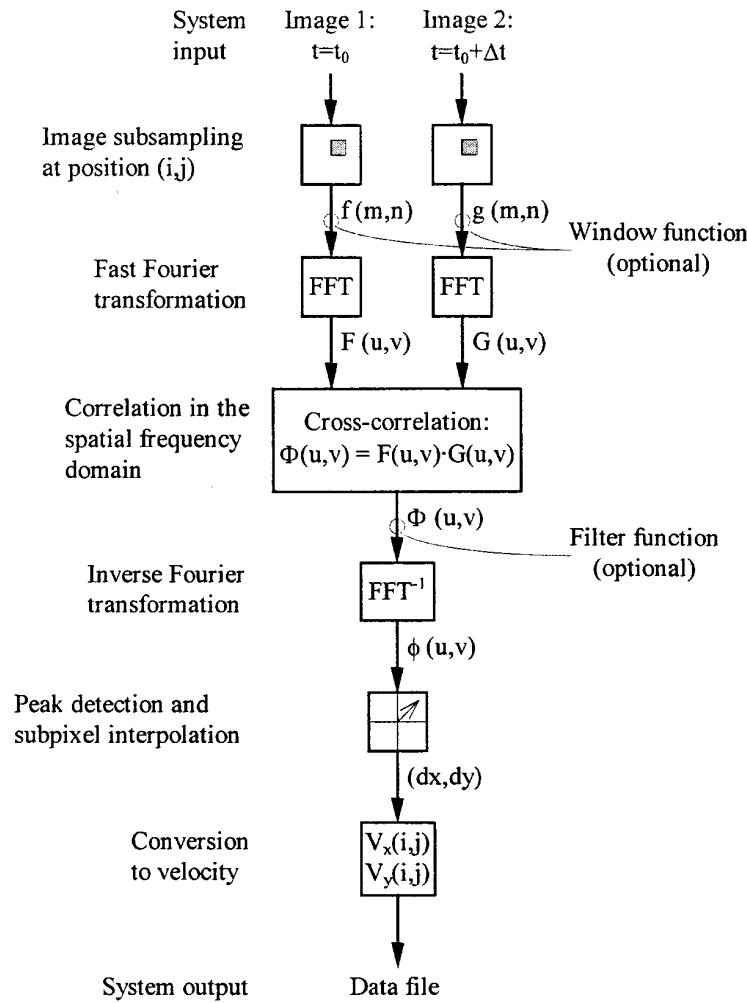


Figure II-24 : Organigramme de traitement numérique des mesures 2D P.I.V.

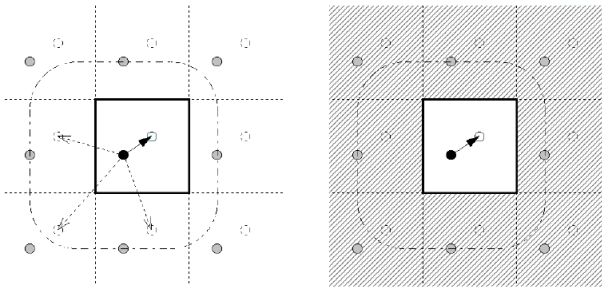


Figure II-25 : Les particules fantômes et les intercorrélations fantômes (flèches en pointillés) montrées dans la figure gauche sont éliminées grâce à la « window fonction » dans la figure droite.

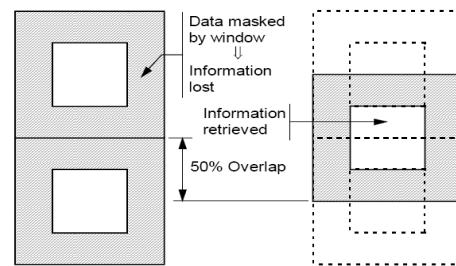


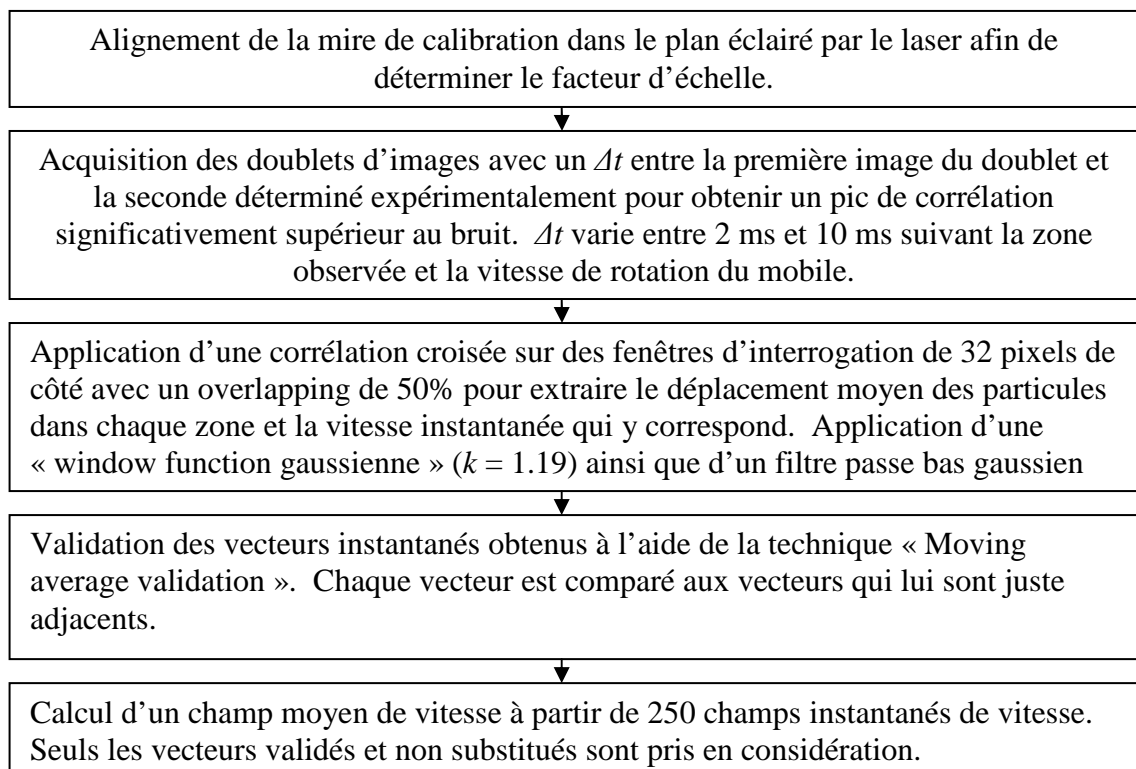
Figure II-26 : Illustration d'un overlapping vertical de 50%

Les vecteurs instantanés de vitesse obtenus par corrélation croisée doivent encore être validés. En effet, le déplacement moyen relatif à chaque fenêtre d'interrogation est donné par la position du pic le plus élevé dans le plan de corrélation croisée. Il est cependant possible que le rapport signal sur bruit soit assez faible dans certaines zones d'interrogation. Dans ce cas, tous les pics de corrélation ont une intensité similaire et le pic retenu peut correspondre à un pic de bruit. Ce cas se présente lorsqu'un nombre élevé de particules quittent la fenêtre

d'interrogation entre les deux clichés, soit parce qu'elles passent dans la fenêtre voisine soit parce qu'elles quittent le plan éclairé par le laser. Ces particules ne contribuent pas à la corrélation vraie car leur position finale est manquante. Elles contribuent par contre aux corrélations de bruit, diminuant le rapport signal sur bruit. Diverses techniques de validation existent :

- Validation basée sur la hauteur du pic de corrélation croisée : ce traitement consiste à vérifier que le pic correspondant au déplacement le plus probable des particules émerge effectivement du bruit environnant. Les intensités des pics les importants sont comparées. Généralement, le vecteur instantané sera validé si une différence de 20% entre les deux pics est observée. Dans le cas contraire, le vecteur sera refusé ;
- Validation basée sur la gamme de vitesse lorsque la gamme de vitesse au sein de l'écoulement est connue *a priori*. Il est possible de mettre en évidence des vecteurs instantanés correspondant à des pics de bruit s'ils sortent de la gamme;
- Validation basée sur une comparaison du vecteur instantané à ses voisins : cette méthode est basée sur le fait que le champ de vitesse ne présente pas de variations brusques. Un vecteur sera accepté à condition que sa direction et sa norme ne soient pas trop différentes de celles de ses voisins. Cette méthode présente l'avantage par rapport aux deux précédentes de permettre l'évaluation du vecteur instantané même en cas de rejet car le vecteur rejeté est remplacé par la moyenne des vecteurs voisins.

En pratique, le traitement appliqué sur les couplets d'images brutes acquises par la caméra CCD pour extraire les champs instantanés de vitesse validés sont repris dans le schéma ci-dessous. Les valeurs choisies pour chaque paramètre sont également mentionnées sur ce schéma.



Annexe II-2 : Mise en évidence de la nature turbulente de l'écoulement dans les conditions d'agitation étudiées dans ce travail

L'écoulement turbulent dans une cuve agitée se caractérise par diverses propriétés telles que :

- Une invariance du champ de vitesse lorsque ce dernier est normé par la vitesse en bout de pale, égale à $\pi N d$;
- Une invariance du champ de l'énergie cinétique turbulente k , lorsque ce dernier est normé par le produit $N^2 d^2$;
- Une invariance du nombre de puissance et du nombre de pompage quelle que soit la valeur du nombre de Reynolds.

Montrer ces invariances dans les conditions d'agitation étudiées permet d'apporter la preuve que l'écoulement au sein de la cuve agitée est pleinement turbulent.

L'invariance des champs de vitesse de chaque mobile est démontrée en extrayant, à chaque vitesse de rotation étudiée, un certain nombre de profils axiaux et radiaux dans le champ moyen de vitesse. Ces profils de vitesse sont ensuite normés par la vitesse en bout de pale et comparés entre eux. Les Figures II-27 à II-30 illustrent les profils axiaux et radiaux de vitesse normée obtenus respectivement pour les mobiles TTP 125 et EE 150. La position, dans la cuve, de ces profils axiaux ($x = \text{constante}$) et radiaux ($y = \text{constante}$) est indiquée au-dessus de chaque graphique. Notons que les portions de profil où la vitesse est nulle correspondent soit aux zones situées hors de la cuve, soit à la zone balayée par le mobile où un masque est appliqué. Les Figures II-27 à II-30 montrent que les profils de vitesse normés obtenus pour chaque vitesse de rotation se superposent remarquablement bien, ce qui prouve l'invariance des champs de vitesse.

La résolution spatiale des mesures 2D P.I.V., qui est de l'ordre de 2.6 mm, ne nous permet pas de démontrer l'invariance des champs de l'énergie cinétique turbulente k normée. En effet, une estimation fiable de k est obtenue si la résolution spatiale des mesures est inférieure ou égale à la micro-échelle de Taylor. Or dans le cas présent, on constate que la résolution spatiale est une à deux fois plus grande dans certaines parties de l'écoulement que la micro-échelle de Taylor si cette dernière est estimée par la formule (Hall *et al.*, 2005):

$$\lambda_{Taylor}^2 = \frac{10\nu L_e}{1.1\sqrt{(u')^2}} \quad (II-16)$$

où L_e est la macro-échelle de Taylor supposée égale à la moitié de la hauteur de la pale du mobile, ν est la viscosité cinématique et $\sqrt{(u')^2}$ est la moyenne quadratique de la fluctuation de la vitesse ($u' = u - \bar{u}$).

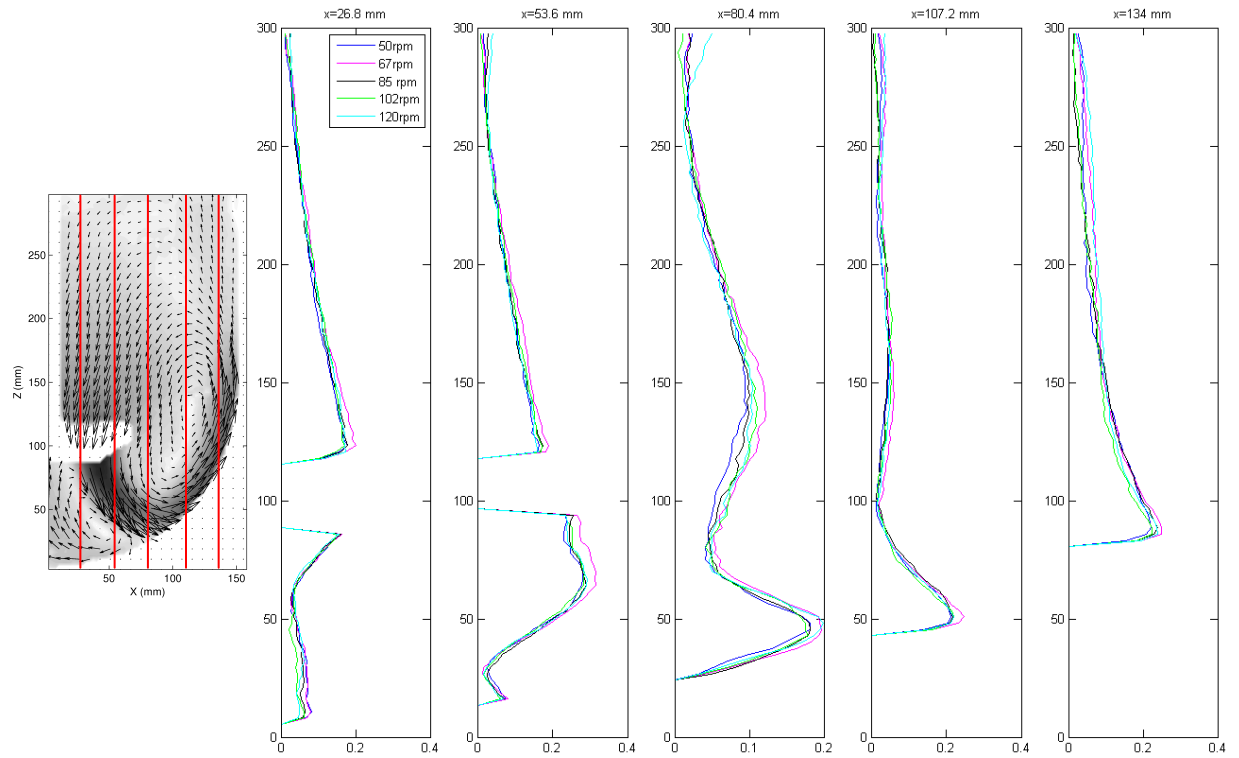


Figure II-27 : Profils axiaux de vitesse normés par la vitesse en bout de pale obtenus pour le mobile TTP 125.

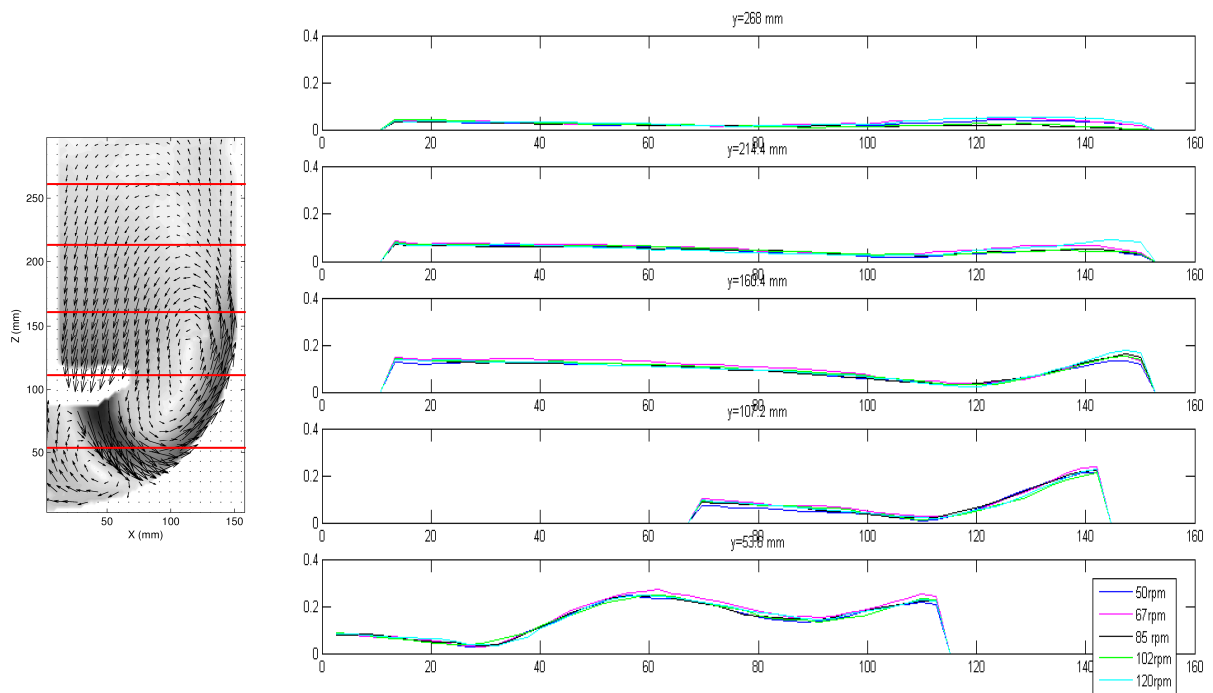


Figure II-28 : Profils radiaux de vitesse normés par la vitesse en bout de pale obtenus pour le mobile TTP 125.

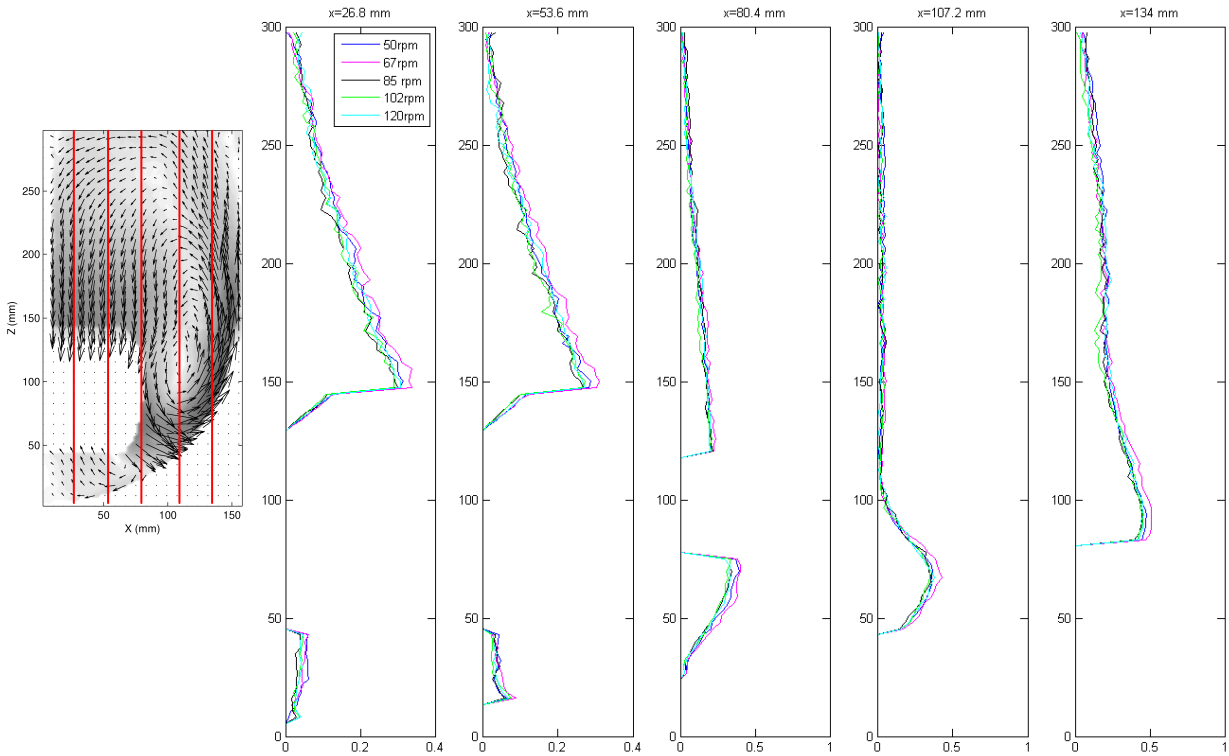


Figure II-29 : Profils axiaux de vitesse normés par la vitesse en bout de pale obtenus pour le mobile EE 150.

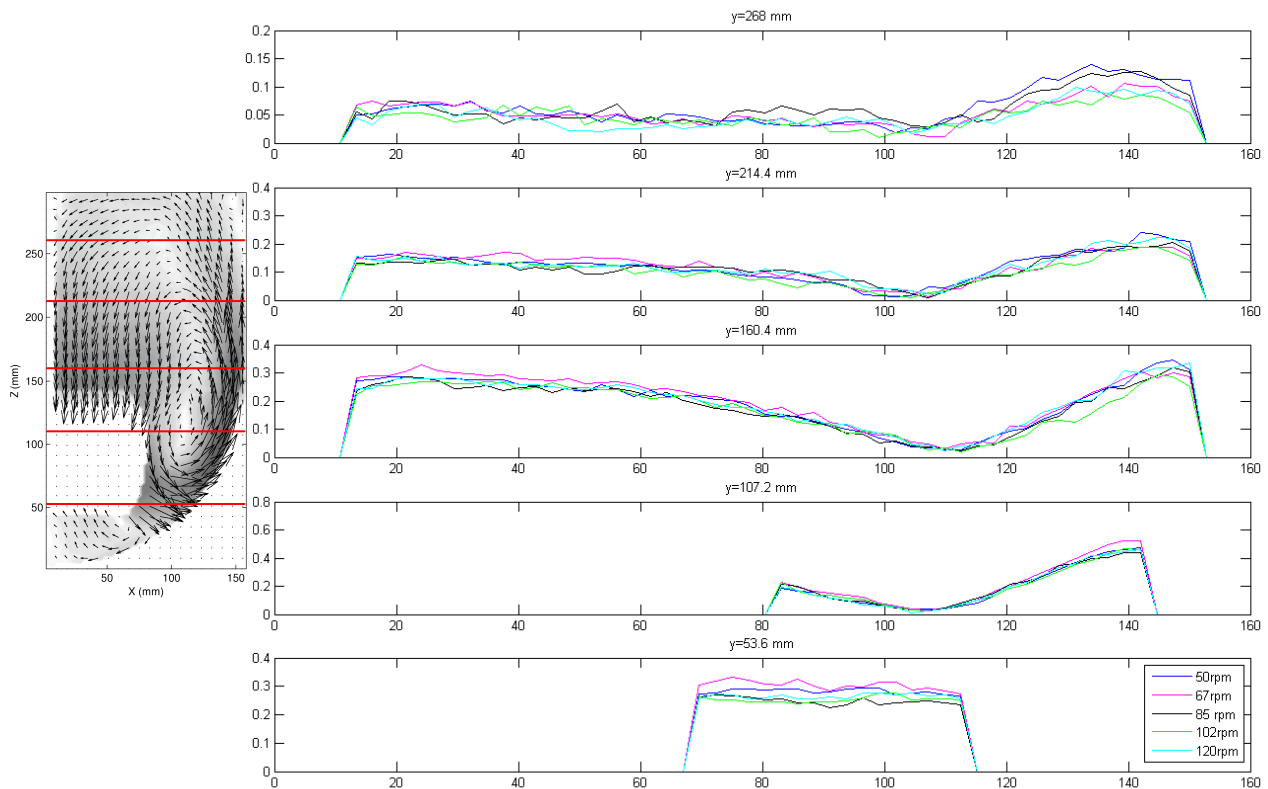


Figure II-30 : Profils radiaux de vitesse normés par la vitesse en bout de pale obtenus pour le mobile EE 150.

Avant de prouver la constance du nombre de puissance et du nombre de pompage avec le nombre de Reynolds, nous allons tout d'abord expliciter la manière dont nous avons déterminé ces deux nombres.

Comme indiqué au Point 2.4 de ce chapitre, le nombre de puissance de chaque mobile est estimé à partir de la puissance dissipée, cette dernière étant elle-même calculée à partir du couple fourni par le moteur pour mettre le fluide en mouvement.

$$N_p = \frac{P}{\rho_l N^3 d^5} \quad (II-17)$$

Le nombre de pompage est, quant à lui, estimé à partir du débit de pompage Q_p . Ce dernier est défini comme la quantité de fluide qui traverse le volume balayé par le mobile par unité de temps. Il peut être estimé en intégrant les composantes axiale \overline{u}_y et radiale \overline{u}_x du champ moyen de vitesse le long des trois surfaces délimitant le plus petit cylindre (« camembert ») qui entoure complètement le mobile (Figure II-31):

$$Q_p = \frac{1}{2}(Q_{entrant} + Q_{sortant}) = \frac{1}{2} \left[\int_{Y-W/2}^{Y+W/2} \pi d |\overline{u}_x|_{x=d/2} dy + \int_0^{d/2} 2 \pi d |\overline{u}_y|_{y=Y-W/2} dr + \int_0^{d/2} 2 \pi d |\overline{u}_y|_{y=Y+W/2} dr \right] \quad (II-18)$$

Les composantes \overline{u}_x et \overline{u}_y étant prises en valeur absolue, le terme entre crochets correspond à la somme des débits entrant et des débits sortant à travers la surface du cylindre. La masse et le volume de fluide dans le cylindre étant nécessairement conservés, le débit entrant doit être égal au débit sortant et égal aussi au débit de pompage.

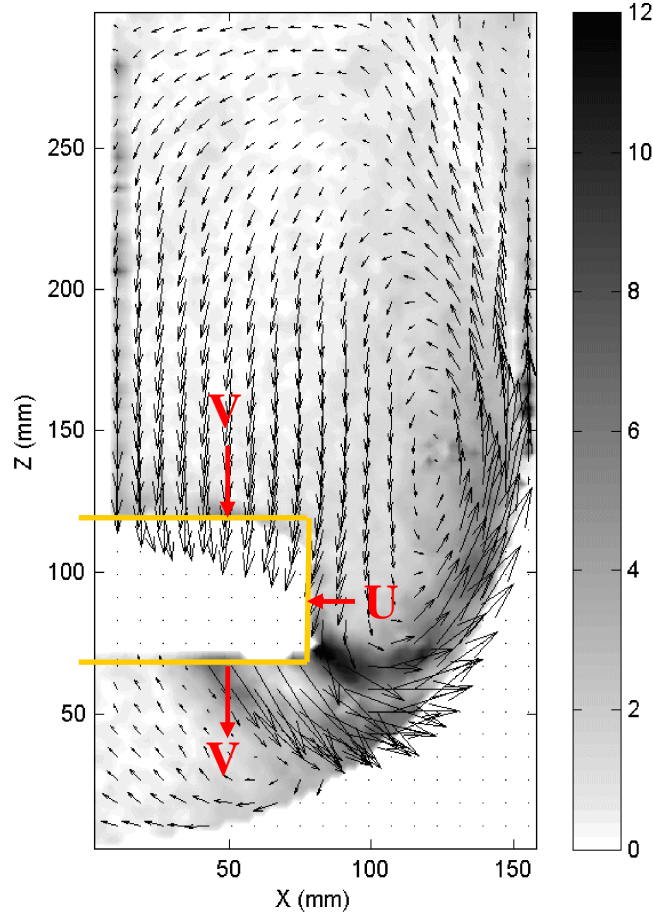


Figure II-31 : Illustration de la méthode appliquée pour estimer le débit de pompage traversant chaque mobile.

Le nombre de pompage N_{Qp} est la forme adimensionnelle du débit de pompage et est estimé à partir de ce dernier par la relation :

$$N_{Qp} = \frac{Q_p}{N d^3} \quad (II-19)$$

En écoulement turbulent, ces deux nombres sont indépendants du nombre de Reynolds. Les courbes présentées sur la Figure II-32 et la Figure II-33 montrent effectivement que les nombres de pompage et de puissance mesurés pour les différents mobiles sont constants aux erreurs de mesures près dans toute la gamme des nombres de Reynolds testés.

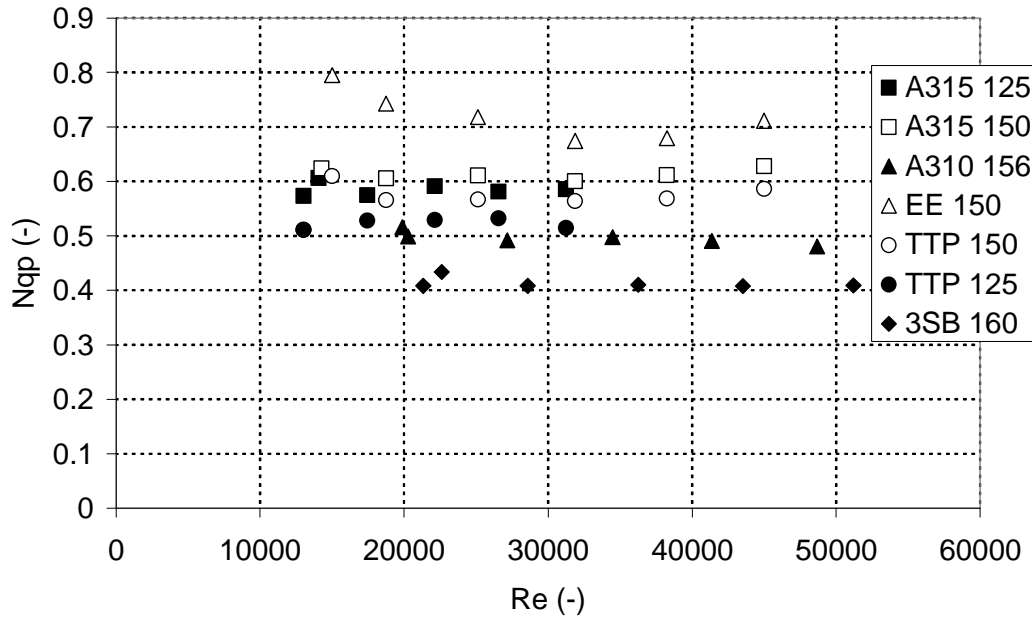


Figure II-32 : Constance du nombre de pompage avec le nombre de Reynolds.

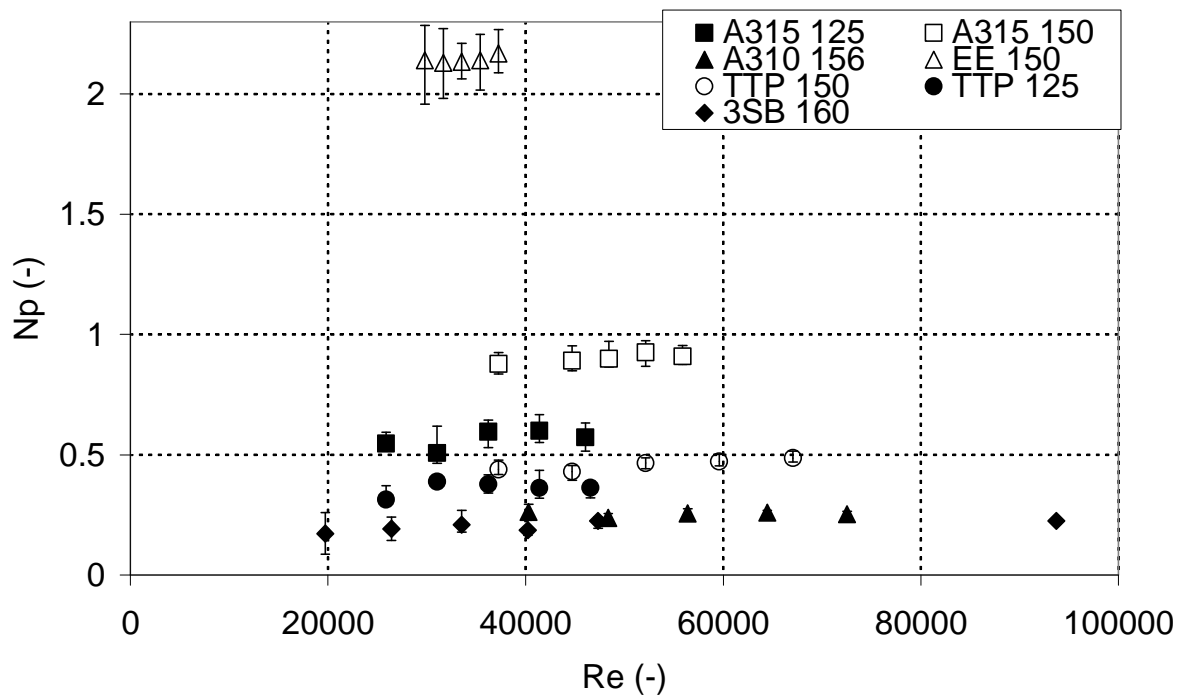


Figure II-33 : Constance du nombre de puissance avec le nombre de Reynolds. Les erreurs de mesure sont représentées par les barres d'erreurs.

Annexe II-3 : Comparaison des nombres de puissance et de pompage mesurés dans ce travail par rapport aux valeurs annoncées dans la littérature

Le Tableau II-6 ci-dessous reprend les valeurs des nombres de puissance et de pompage mesurées dans ce travail, ainsi que des valeurs relevées dans la littérature.

Tableau II-6 : Comparaison des valeurs des nombres de pompage et de puissance mesurées dans ce travail avec celles annoncées dans la littérature.

Références	N_{Qp}	N_p	Nombre de contre-pales, type de fond de cuve, d , d/T , Y/H
mobiles TTP 125 et TTP 150			
Aubin <i>et al.</i> (2001)	0.67		4, fond incurvé, 95mm, 0.5, 0.33
Houcine <i>et al.</i> (2000)		0.39	4, fond plat, 115 mm, 0.4, 0.33
		0.37	4, fond plat, 115 mm, 0.4, 0.5
		0.41	4, fond plat, 144 mm, 0.5, 0.33
		0.40	4, fond plat, 144 mm, 0.5, 0.5
Mavros et Bertrand (1996)	0.73		4, fond incurvé, 95mm, 0.5, 0.33
Roustan (2005)	0.65	0.40	3, fond plat, /, $0.28 < d/D < 0.5$, 0.33
Ce travail	0.52	0.37±0.04	2, fond hémisphérique, 125 mm, 0.4, 0.33
	0.58	0.46±0.02	150 mm, 0.5, 0.33
mobile A315 125 et A135 150			
McFarlane <i>et al.</i> (1995)		0.76	4, fond plat, 224 mm, 0.40, 0.45
		0.84	4, fond plat, 224 mm, 0.40, 0.25
Roustan (2005)	0.73	0.75	4, fond plat, /, $0.3 < d/D < 0.5$, 0.33
Ce travail	0.58	0.58±0.05	2, fond hémisphérique, 125 mm, 0.4, 0.33
	0.61	0.90±0.05	150 mm, 0.5, 0.33
mobile A310 156			
Bugay <i>et al.</i> (2002)	0.55		4, fond plat, 150 mm, 0.33, 0.33
Ibrahim et Nienow (1996)		0.32	4, fond incurvé, 151 mm, 0.52, 0.17
		0.29	4, fond incurvé, 151 mm, 0.52, 0.25
		0.26	4, fond incurvé, 151 mm, 0.52 ; 0.33
		0.37	4, fond incurvé, 136 mm, 0.47, 0.17
		0.34	4, fond incurvé, 136 mm, 0.47, 0.25
		0.33	4, fond incurvé, 136 mm, 0.47, 0.33
Mavros et Bertrand (1996)	0.62		4, fond incurvé, 95 mm, 0.5, 0.33
Musgrove and Ruszkowski(1992)	0.51	0.28	4, fond incurvé, 97 mm, 0.33, 0.33
	0.53	0.26	4, fond incurvé, 133 mm, 0.5, 0.33
Roustan (2005)	0.56	0.30	4, fond plat, /, $0.3 < d/D < 0.5$, 0.33
Wu <i>et al.</i> (2000)	0.57	0.31	4, fond plat, /, $0.32 < d/D < 0.47$, 0.33
Ce travail	0.50	0.25±0.02	2, fond hémisphérique, 156 mm, 0.52, 0.33
mobile 3SB 160			
Roustan (2005)	0.87	0.35	3, fond plat, /, $0.3 < d/D < 0.5$, 0.33
Ce travail	0.41	0.23±0.02	2, fond hémisphérique, 160 mm, 0.53, 0.33
mobile EE 150			
Zhu <i>et al.</i> (2009)	0.73	2.1	4, fond plat, 6.75 mm, 0.45, 0.25
Ce travail	0.72	2.14	2, fond hémisphérique, 150 mm, 0.50, 0.33

Suite à l'examen du Tableau II-6, deux observations peuvent être faites.

D'une part, à l'exception du nombre de puissance du mobile TTP 150 et A315 150, les valeurs des nombres de puissance et de pompage obtenues dans ce travail sont soit en bon accord avec la littérature (A310 156, EE 150, TTP 125) soit plus faibles (A315 125, 3SB 160).

D'autre part, les nombres de puissance et de pompage obtenus pour chaque mobile varient fortement d'une étude à l'autre et donc d'une configuration géométrique de cuve à l'autre. Cette observation va à l'encontre de l'idée véhiculée par les fabricants de mobiles selon laquelle un design défini de mobile est caractérisé, en régime turbulent, par des propriétés intrinsèques, *i.e.* des valeurs constantes et définies des nombres de puissance et de pompage, indépendamment de la géométrie de la cuve. Comme mentionné par Xuereb *et al.* (2006), cette idée n'est correcte que lorsque le mobile est placé dans un milieu infini. En pratique, cette situation n'est jamais rencontrée dans une cuve agitée, vu la présence de parois et d'éléments internes. La structure de l'écoulement et dès lors, les valeurs des nombres de pompage et de puissance sont influencées par la géométrie de la cuve. Dans les paragraphes suivants, nous allons plus particulièrement montrer que le rapport entre le diamètre du mobile et le diamètre de la cuve, la distance entre le fond de la cuve et les pales du mobile ainsi que le nombre de contre-pales ont une grande influence sur les nombres de pompage et de puissance.

Pour montrer l'influence du rapport d/T sur les nombres de pompage et de puissance, l'écoulement généré par les mobiles A315 et TTP a été étudié avec deux diamètres de mobiles : 125 mm ($d/T = 0.4$) et 150 mm ($d/T = 0.5$). Le Tableau II-6 montre que nous obtenons une faible augmentation du nombre de pompage et une nette augmentation du nombre de puissance lorsque le rapport d/T augmente. Ces résultats sont en bon accord avec les études de Wu et Pullum (2000) et Houcine *et al.* (2000) qui observent respectivement une augmentation de 20% du nombre de pompage du mobile A310 lorsque le rapport d/T passe de 0.32 à 0.47 et une augmentation de 10% du nombre de puissance du mobile TTP lorsque le rapport d/T passe de 0.4 à 0.5. Par contre, l'étude d'Ibrahim et Nienow (1996) montre une décroissance du nombre de puissance du mobile A310 lorsque le diamètre du mobile augmente. Ce résultat, opposé aux observations réalisées dans les autres études, est certainement dû à la présence d'une phase solide (billes de verres) au sein de la phase liquide lors des mesures. De plus, Xuereb *et al.* (2006) justifient l'accroissement du nombre de puissance avec l'augmentation du diamètre du mobile de la manière suivante : une augmentation du rapport d/T entraîne le rapprochement des pales du mobile vis-à-vis des parois latérales et du fond de la cuve, augmentant ainsi la perte de charge dans les filets de fluide emprisonnés entre le mobile et ces parois. Cette augmentation de la perte de charge entraîne naturellement une augmentation du nombre de puissance ; ce dernier étant équivalent à un coefficient de trainée dans une conduite.

L'ensemble de la littérature (Houcine *et al.*, 2000 ; Ibrahim et Nienow, 1996 ; Kumaresan et Joshi, 2006 ; McFarlane *et al.*, 1995 ; Paul *et al.*, 2004, Xuereb *et al.*, 2006) s'entend pour dire que le nombre de puissance augmente lorsque la distance entre les pales du mobile et le fond

de la cuve (Y/T) diminue. Tout comme dans le cas d'une augmentation du diamètre du mobile, la croissance du nombre de puissance provient d'une augmentation de la perte de charge au sein de l'écoulement du au rapprochement du fond de la cuve. Nous avons vérifié expérimentalement cette affirmation pour deux mobiles étudiés dans ce travail (EE 150 et TTP 125) et nous avons effectivement observé une augmentation respectivement de 6% et 20% de leur nombre de puissance lorsque le rapport Y/T passe de 0.4 à 0.33. L'évolution du nombre de pompage avec le rapport Y/T est quant à lui plus complexe. En effet, d'après Xuereb *et al.* (2006) et Wu et Pullum (2000), le nombre de pompage augmenterait avec le rapport Y/T pour les faibles valeurs de ce dernier jusqu'à atteindre un maximum. Il diminuerait ensuite pour les valeurs de Y/T les plus élevées. D'après les travaux de Wu et Pullum (2000), ce maximum serait atteint pour le mobile A310 aux alentours d'un Y/T égal à 0.33. A partir de mesures P.I.V., nous avons examiné l'évolution du nombre de pompage des mobiles EE 150 et TTP 125 lorsque le rapport Y/T varie de 0.33 à 0.4. Nous avons observé une croissance de 27% du nombre de pompage du mobile TTP 125 et une décroissance de 15% du nombre de pompage du mobile EE 150.

La cuve étudiée dans ce travail a la spécificité de ne contenir que deux contre-pales, alors que les cuves décrites dans les études mentionnées dans le Tableau II-6 en ont généralement quatre. L'effet du nombre de contre-pales sur le nombre de puissance est bien connu. Paul *et al.* (2004) ou Xuereb *et al.* (2006) présentent tous deux dans leur livre de référence respectif une évolution du nombre de puissance avec le nombre $N_b b/T$ selon la courbe présentée à la Figure II-34. Notons que N_b correspond au nombre de contre-pales et b à la largeur des contre-pales. Sachant que, dans notre étude, b vaut $T/10$, nous constatons sur la Figure II-34 que le nombre de puissance devrait croître monotonement lorsque le nombre de contre-pales passe de deux ($N_b b/T = 0.2$) à quatre ($N_b b/T = 0.4$). Cette affirmation a été vérifiée expérimentalement pour les mobiles EE 150 et TTP 125. Nous avons constaté une augmentation de 15% du nombre de puissance du mobile EE 150 mais pas d'évolution notable du nombre de puissance du mobile TTP 125. La même évolution est observée pour le nombre de pompage : celui du mobile EE 150 augmente de 21% lorsque le nombre de contre-pales dans la cuve passe de deux à quatre, tandis que celui du mobile TTP 125 reste constant. L'augmentation du nombre de pompage avec le nombre de contre-pales est logique puisque les contre-pales sont installées dans la cuve dans le but de « casser » le mouvement de rotation tangentiel du fluide et de favoriser, dans ce cas-ci, un mouvement de pompage axial. La différence d'évolution des nombres de puissance et de pompage des mobiles EE 150 et TTP 125 peut s'expliquer par leur encombrement relatif dans la cuve. En effet, le Tableau II-6 montre clairement que, d'une part, le mobile EE 150 a un diamètre plus important que le mobile TTP 125 et que d'autre part, qu'il balaie un pourcentage de volume de la cuve égal à 8.39 % tandis que le mobile TTP 125 balaie uniquement un pourcentage égal à 1.65 %. Dès lors, il semble raisonnable de penser que les interactions entre les filets de fluide sortant du mobile et les contre-pales doivent être nettement plus intenses pour le mobile EE 150 que pour le mobile TTP 125.

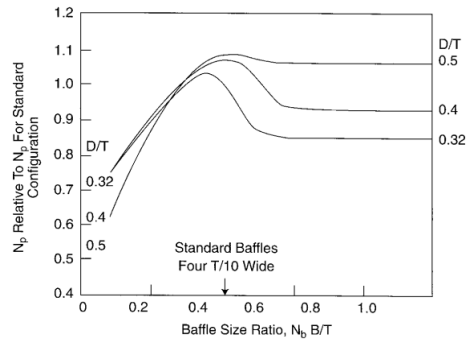


Figure II-34 : Évolution du rapport entre les nombres de puissance mesurés dans des conditions non-standard et dans des conditions standard, en fonction du nombre de contre-pales présentes dans la cuve (Paul et al, 2004).

Liste des symboles

A310 156	Mobile axial de modèle A310 (Lightnin) et de diamètre $d = 156$ mm	
A315 125	Mobile axial de modèle A315 (Lightnin) et de diamètre $d = 125$ mm	
A315 150	Mobile axial de modèle A315 (Lightnin) et de diamètre $d = 150$ mm	
EE 150	Mobile axial de modèle « Elephant Ear » (Applikon) diamètre $d = 150$ mm	
3SB 160	Mobile axial de modèle « 3 streamed blade » (VMI-Rayenri) $d = 160$ mm	
TTP 125	Mobile axial de modèle TTP (Mixel) et de diamètre $d = 125$ mm	
TTP 150	Mobile axial de modèle TTP (Mixel) et de diamètre $d = 150$ mm	
b	Largueur des contre-pales	[m]
d	Diamètre du mobile	[m]
d_p	Diamètre des microporteurs	[m]
\overline{D}_{moyen}	Déplacement moyen des particules dans une zone d'interrogation en P.I.V.	[m]
e	Epaisseur des pales du mobile	[m]
g	Accélération de la pesanteur	[m s ⁻²]
H	Hauteur du liquide	[m]
h	Hauteur des contre-pales	[m]
k	Energie cinétique turbulente	[m ² s ⁻²]
L_e	Macro-échelle de Taylor	[m]
M	Facteur d'échelle entre les unités métriques et pixels	[pixel m ⁻¹]
N	Vitesse de rotation	[rpm]
N'	Vitesse de rotation	[rad s ⁻¹]
N_b	Nombre de contre-pales dans la cuve	[-]
N_{js}	Vitesse de rotation minimale de maintien en suspension complète des microporteurs	[rpm]
N_p	Nombre de puissance	[-]
N_{Qp}	Nombre de pompage	[-]
P	Puissance globale dissipée	[W]
Q_p	Débit de pompage	[m ³ s ⁻¹]
Re	Nombre de Reynolds de l'écoulement	[-]
S	Constante de Zwietering	[-]
t	temps	[s]
T	Diamètre de la cuve	[m]
T'	Couple exercé sur l'axe de rotation du mobile	[N m]
TCS	Turbulent Collision severity index	[W]
TCS_{eddies}	Turbulent Collision severity index modèle 1	[W]
TCS_{shear}	Turbulent Collision severity index modèle 2	[W]
u	Vitesse instantanée	[m s ⁻¹]
\overline{u}	Vitesse moyenne temporelle	[m s ⁻¹]
u'	Fluctuation de la vitesse	[m s ⁻¹]
$\sqrt{\overline{u'^2}}$	Moyenne quadratique de la fluctuation de la vitesse	[m s ⁻¹]
V	Volume de la cuve	[m ³]
V_{swept}	Volume balayé par le mobile	[m ³]
V_{moyen}	Moyenne de la distribution de la vitesse moyennée sur le temps	[m s ⁻¹]
$V_{90\%}$	Percentile 90 de la distribution de la vitesse moyennée sur le temps	[m s ⁻¹]

\vec{V}_{zone}	Vecteur de la vitesse dans une fenêtre d'interrogation en P.I.V.	[m s ⁻¹]
v_{br}	Moyenne quadratique de la vitesse relative entre deux Microporteurs voisins	[m s ⁻¹]
W	Hauteur des pales du mobile	[m]
Y	Distance entre le centre du mobile et le fond de la cuve	[m]
%solide	Pourcentage en volume de solide dans la suspension	[%]
α	Fraction volumique de microporteurs	[%]
Δt	Intervalle de temps	[s]
$\Delta \rho$	Différence de masse volumique entre la phase solide et la phase liquide de la suspension	[kg m ⁻³]
ε	Taux de dissipation de l'énergie cinétique turbulente	[m ² s ³]
ε_{moyen}	Estimation de ε par la puissance globale dissipée divisé le volume totale de la cuve	[m ² s ³]
ε_{max}	Estimation de ε par la puissance globale dissipée divisé le volume balayé par le mobile	[m ² s ³]
λ_K	Échelle de Kolmogorov	[m]
$\lambda_{K,min}$	Valeur minimale de l'échelle de Kolmogorov	[m]
$\lambda_{K,moyen}$	Valeur moyenne de l'échelle de Kolmogorov	[m]
λ_{Taylor}	Micro-échelle de Taylor	[m]
ν	Viscosité cinématique du fluide	[m ² s]
ρ_l	Masse volumique du fluide	[kg m ⁻³]
ρ_p	Masse volumique des microporteurs	[kg m ⁻³]
ϕ_{fg}	Fonction de corrélation croisée	[-]

Table des figures

<i>Figure II-1 : Mobile de type :(a) Turbine à 4 pales inclinées classique, (b) Turbine à 6 pales inclinées classique, (c) et (d) Turbines à 6 pales inclinées aux designs modifiés.....</i>	<i>58</i>
<i>Figure II-2 : Mobile de type :(a) Cheminer HE-3, (b) Prochem Maxflo T, (c) Lighnin A310, (d) Lighnin A315, (e) Mixel TTP.....</i>	<i>58</i>
<i>Figure II-3 : Mobile de type (a) B2 de Hayward Tyler et (b) « Elephant Ear » d'Applikon... </i>	<i>59</i>
<i>Figure II-4 : Design de la cuve utilisée dans ce travail.....</i>	<i>60</i>
<i>Figure II-5 : Montage optique composé de la cuve, de l'aquarium et de la table en profilé aluminium supportant le miroir incliné à 45°.....</i>	<i>60</i>
<i>Figure II-6 : Design des mobiles TTP (Mixel).....</i>	<i>61</i>
<i>Figure II-7 : Design des mobiles A315 (Lighnin).....</i>	<i>61</i>
<i>Figure II-8 : Design du mobile A310 (Lighnin).....</i>	<i>61</i>
<i>Figure II-9 : Design du mobile 3SB (VMI).....</i>	<i>61</i>
<i>Figure II-10 : Design du mobile EE (Applikon).....</i>	<i>62</i>
<i>Figure II-11 : Cytodex1TM avec des cellules animales adhérentes à leur surface.....</i>	<i>62</i>
<i>Figure II-12 : Illustration de suspensions (a) partielle, (b) complète et (c) uniforme.....</i>	<i>63</i>
<i>Figure II-13 : Schéma de principe de la technique 2D P.I.V.....</i>	<i>64</i>
<i>Figure II-14 : (a) Dispositif 2D P.I.V, (b) Laser Nd-Yag, (c) Caméra Hi-Sense, (d) Processeur Corrélateur.....</i>	<i>65</i>
<i>Figure II-15 : Zone inférieure (cadre bleu) et zone supérieure (cadre rouge) de la cuve successivement observées par la caméra lors des mesures 2D P.I.V.....</i>	<i>66</i>
<i>Figure II-16 : Panneau de contrôle du moteur Heidolph RZR 2102.....</i>	<i>67</i>
<i>Figure II-17 : Champs moyens de vitesse :</i>	<i>72</i>
<i>Figure II-18 : Évolution de la vitesse spécifique de mort (◊), de la croissance (○), de la population maximale (◇) après 24 h (Δ) en fonction de la taille de l'échelle de Kolmogorov.....</i>	<i>74</i>
<i>Figure II-19 : Évolution de la vitesse spécifique de mort (◊), de la croissance (○), de la population maximale (◇) après 24 h (Δ) en fonction de la valeur de TCS.....</i>	<i>74</i>

Figure II-20 : Évolution de la moyenne du champ moyen de vitesse en fonction de la vitesse de rotation du mobile exprimée comme un facteur multiplicatif de N_{js}	77
Figure II-21 : Évolution du percentile 90 du champ moyen de vitesse en fonction de la vitesse de rotation du mobile exprimée comme un facteur multiplicatif de N_{js}	77
Figure II-22 : Principe de la corrélation croisée appliquée à une fenêtre d'interrogation....	80
Figure II-23 : Plan de corrélation.	81
Figure II-24 : Organigramme de traitement numérique des mesures 2D P.I.V.....	82
Figure II-25 : Les particules fantômes et les intercorrélations fantômes (flèches en pointillés) montrées dans la figure gauche sont éliminées grâce à la « window fonction » dans la figure droite.	82
Figure II-26 : Illustration d'un overlapping vertical de 50%.....	82
Figure II-27 : Profils axiaux de vitesse normés par la vitesse en bout de pale obtenus pour le mobile TTP 125.....	85
Figure II-28 : Profils radiaux de vitesse normés par la vitesse en bout de pale obtenus pour le mobile TTP 125.....	85
Figure II-29 : Profils axiaux de vitesse normés par la vitesse en bout de pale obtenus pour le mobile.....	86
Figure II-30 : Profils radiaux de vitesse normés par la vitesse en bout de pale obtenus pour le mobile EE 150.....	86
Figure II-31 : Illustration de la méthode appliquée pour estimer le débit de pompage traversant chaque mobile.....	87
Figure II-32 : Constance du nombre de pompage avec le nombre de Reynolds.....	88
Figure II-33 : Constance du nombre de puissance avec le nombre de Reynolds. Les erreurs de mesure sont représentées par les barres d'erreurs.....	88
Figure II-34 : Évolution du rapport entre les nombres de puissance mesurés dans des conditions non-standard et dans des conditions standard, en fonction du nombre de contre-pales présentes dans la cuve (Paul et al, 2004).....	92

Table des tableaux

<i>Tableau II-1: Caractéristiques géométriques de la cuve utilisée dans ce travail.....</i>	<i>60</i>
<i>Tableau II-2 : Caractéristiques géométriques des mobiles utilisés dans ce travail.....</i>	<i>62</i>
<i>Tableau II-3 : Propriétés physiques des microporteurs CytodexITM.....</i>	<i>62</i>
<i>Tableau II-4 : Présentation pour chaque mobile de sa vitesse de rotation minimale de maintien des microporteurs en suspension complète N_{js}, de la constante S de la corrélation de Zwietering, du nombre de Reynolds de l'écoulement à la vitesse de rotation N_{js}, de la moyenne et du percentile 90 de la distribution numérique du champ moyen de vitesse à la vitesse de rotation N_{js} et du nombre de puissance du mobile.....</i>	<i>70</i>
<i>Tableau II-5 : Comparaison des mobiles sur base des contraintes mécaniques qu'ils génèrent à leur vitesse de rotation N_{js} respective.....</i>	<i>73</i>
<i>Tableau II-6 : Comparaison des valeurs des nombres de pompage et de puissance mesurées dans ce travail avec celles annoncées dans la littérature.</i>	<i>89</i>

Bibliographie

Aubin, J., Mavros, P., Fletcher, D.F., Xuereb, C., Bertrand, J., 2001. Effect of axial agitator configuration (up-pumping, down-pumping, reverse rotation) on flow patterns generated in stirred vessels. International Symposium on Mixing in Industrial Processes-ISMIP4, 14-16 May 2001, Toulouse, France.

Bao, Y., Huang, X., Shi, L., Wang, Y., 2002. Mechanism of off-Bottom suspension of solid particles in a mechanical stirred tank. Chinese Journal of Chemical Engineering 10, 476-479.

Bugay, S., Escudié, R., Liné, A., 2002. Experimental analysis of hydrodynamics in axially agitated tank. AIChE Journal 48, 463-474.

Cherry, R.S., Papoutsakis, E.T., 1986. Hydrodynamic effects on cells in agitated tissue culture reactors. Bioprocess Engineering 1, 29-41.

Cherry, R.S., Papoutsakis, E.T., 1988. Physical-mechanisms of cell-damage in microcarrier cell-culture bioreactors. Biotechnology and Bioengineering 32, 1001-1014.

Croughan, M.S., E.S. Sayre, and D.I.C. Wang, 1989. Viscous reduction of turbulence damage in animal-cell culture. Biotechnology and Bioengineering 33, 862-872.

Firoz, R. K., Chris, D.R., Grahan, K.H., 2004. A multi-block approach to obtain angle resolved PIV measurements of the mean flow and turbulence fields in a stirred vessel. Chemical Engineering Technology 27, 264-369.

Houcine, I., Plasari, E., David, R., 2000. Effects of the Stirred Tank's Design on Power Consumption and Mixing Time in Liquid Phase. Chemical Engineering and Technology 23, 605-613.

Ibrahim, S., Nienow, A.W., 1996. Particle suspension in the turbulent regime : The effect of impeller type and impeller/vessel configuration. Chemical Engineering Research and Design 74, 679-688.

Ibrahim, S., Nienow, A.W., 2004. Suspension of microcarrier for cell culture with axial flow impellers. Chemical Engineering Research and Design 82, 1082-1088

Jaworski, Z., Nienow, A.W., Dyster, K.N., 1996. An LDA study of the turbulent flow field in a baffled vessel agitated by an axial, down pumping hydrofoil impeller. Canadian Journal of Chemical Engineering 74, 3-15.

Jaworski, Z., Dyster, K.N., Nienow, A.W., 2001. The effect of the size, location and pumping direction of a pitched blade turbine impellers on flow patterns: LDA measurements and CFD predictions. *Chemical Engineering Research and Science* 79, 887-894.

Khan, F.R., Rielly, C.D., Brown, D.A.R., 2006. Angle-resolved stereo-PIV measurements close to a down-pumping pitched-blade turbine. *Chemical Engineering Science* 61, 2799 – 2806.

Kumaresan, T., Joshi, J.B., 2006. Effect of impeller design on the flow pattern and mixing in stirred tanks. *Chemical Engineering Journal* 115, 173-193.

Mavros, P., Xuereb, C., Bertrand, 1996. Determination of 3-D Flow Fields in Agitated Vessels by Laser Doppler Velocimetry : Effect of Impeller Type and Liquid Viscosity on Liquid Flow Patterns. *Chemical Engineering Research and Design* 74, 658-668

Mavros, P., Xuereb, C., Bertrand, J., 1998. Determination of 3-D flow fields in agitated vessels by laser Doppler velocimetry: use and interpretation of RMS velocities. *Chemical Engineering Research and Design* 76, 223-233.

McFarlane, C.M., Nienow, A.W., 1995. Studies of high solidity ratio hydrofoil impellers for aerated bioreactors. *Biotechnology Progress* 11, 601-607.

Musgrove, M. E. , Ruszkowski, S.W., 1992. The mean flow in the discharge of some novel hydrofoil impellers and its effect on mixing processes. *FMP Report* 1071

Myers, K. J., Fasano, J. B., Corpstein, R.R., 1994. The influence of solid properties on the just-suspended agitation requirements of pitched-blade and high-efficiency impellers. *The Canadian Journal of Chemical Engineering* 72, 745-748.

Nikhade, B.P., Pangarkar, V.G., 2007. A theorem of corresponding hydrodynamic states for estimation of transport properties: Case study of mass transfer coefficient in stirred tank fitted with helical coil. *Industrial and Engineering Chemistry Research* 45, 3095-3100.

Paul, E.L., Atiemo-Obeng, V.A., Kresta, S.M., 2004. *Handbook of industrial mixing: science and practice*. Editions John Wiley & Sons, Danvers.

Raghava Rao, K.S.M.S., Rewatkar, V.B, Joshi, J.B., 1988. Critical impeller speed for solid suspension in mechanically agitated contactors. *AIChE Journal* 34, 1332-1340.

Ranade, V.V., Joshi, J.B., 1989. Flow generated by a pitched blade turbines. I. Measurements using laser Doppler anemometer. *Chemical Engineering Communication* 81, 197-224.

Roustan, M., 2005. Agitation mélange, caractéristiques des mobiles d'agitation. Fascicule J3802 des Techniques de l'Ingénieur. Edition T.I., Paris, France.

Schafer, M., Yianneskis, P., Wachter, P., Durst, F., 1998. Trailing vortices around a 45° pitched blade impeller. *AIChE Journal* 44, 1233-1265.

Simmons, M.J.H., Zhu, H., Bujalski, W., Hewitt, C.J., Nienow, A.W., 2007. Mixing in a model bioreactor using agitators with a high solidity ratio and deep blades. *Chemical Engineering Research and Design* 85, 551-559.

Venkat, R.V., Chalmers, J.J., 1996. Characterization of agitation environments in 250 ml spinner vessel, 3L and 20 L reactor vessels used for animal cell microcarrier culture. *Cyotechnology* 22, 95-102.

Wu, J., Zhu, Y., Bandopadhyay, P.C., Pullum, L., Shepherd, I.C., 2000. Solids suspension with axial-flow impellers. *AIChE Journal* 46, 647-650.

Wu, J., Pullum, L., 2000. Performance analysis of axial-flow mixing impellers. *AIChE Journal* 46, 489-498.

Wu, J., Graham, K.J., Nguyen, B., Mehidi, M.N.N., 2006. Energy efficiency study on axial flow impellers. *Chemical Engineering and Processing* 45, 625-632.

Xuereb, C., Poux, M., Bertrand, J. 2006. Agitation et Mélange : Aspects fondamentaux et applications industrielles. Editions L'Usine Nouvelle, Dunod, Paris.

Zhou, G., Kresta, S., 1996. Distribution of energy between convective and turbulence flow for three frequently used impellers. *Chemical Engineering Research and Design* 74, 379-389.

Zhu, H., Nienow, A.W., Bujalski, W., Simmons, M.J.H., 2009. Mixing studies in a model aerated bioreactor equipped with an up- or a down-pumping 'Elephant Ear' agitator: Power, hold-up and aerated flow field measurements. *Chemical Engineering Research and Design* 87, 307-317.

Zwietering, Th. N., 1958. Suspending of solid particles in liquid by agitators. *Chemical Engineering Science* 8, 244-253

Chapitre III :

Caractérisation eulérienne de l'écoulement turbulent généré par les mobiles TTP 125 et EE 150 dans le bioréacteur à cuve agitée utilisé en culture de cellules animales sur microporteurs

Résumé.....	104
1 Introduction.....	107
2 Appareils, méthodes et validation.....	108
2.1 3D P.I.V.	108
2.1.1 Principe de la technique	108
2.1.2 Conditions d'acquisition des mesures 3D P.I.V.....	111
2.2 Validation des mesures 3D P.I.V.	114
3 Caractérisation de la composante moyenne de l'écoulement.....	120
3.1 Description qualitative des champs moyens générés par les mobiles TTP 125 et EE 150	121
3.2 Orientation de la composante principale de l'écoulement moyen.....	124
3.3 Distribution numérique des champs moyens	125
3.4 Effet des deux contre-pales sur la structure de l'écoulement moyen.....	126
3.5 Synthèse	132
4 Caractérisation de la composante turbulente de l'écoulement	132
4.1 Distribution de l'énergie cinétique turbulente.....	132
4.2 Distribution du taux de dissipation de l'énergie cinétique turbulente	138
4.2.1 Méthodes de calcul de \mathcal{E}	139
4.2.2 Estimation de \mathcal{E} par la méthode dimensionnelle.....	141
4.2.3 Taux de dissipation de l'énergie cinétique turbulente	144
4.3 Synthèse	150
5 Contraintes mécaniques générés au sein de l'écoulement turbulent	150
6 Découpage de la cuve sur base du niveau de contraintes mécaniques.....	154
7 Conclusion.....	159
7.1 Synthèse	159
7.2 Discussions	160
Annexe III-1 : Validation des mesures 3D P.I.V. : résultats relatifs au mobile EE 150	162
Liste des symboles	165
Table des figures	167
Table des tableaux	174
Bibliographie	175

Résumé

Ce chapitre présente les résultats relatifs à la première étape de la méthodologie développée dans cette thèse. Il s'agit de la caractérisation eulérienne de l'écoulement turbulent généré par les deux mobiles TTP 125 et EE 150 lorsqu'ils tournent à leur vitesse minimum de maintien en suspension complète des microporteurs, N_{js} , ou à des multiples de celle-ci. Les résultats attendus de cette étude sont des cartes décrivant de manière quantitative la répartition spatiale :

- De la vitesse moyenne du fluide ;
- Des propriétés de l'écoulement turbulent telles que l'énergie cinétique turbulente k et son taux de dissipation ε ;
- Des contraintes mécaniques générées au sein de l'écoulement.

La connaissance de ces cartes permet de diviser le volume de la cuve en deux régions : l'une est labélisée comme « problématique pour le développement cellulaire » car les contraintes mécaniques sont au de-là des valeurs supportables par les cellules tandis que l'autre est labélisée comme « non problématique ».

Pour atteindre cet objectif, 300 champs instantanés de vitesse sont mesurés par 3D P.I.V.. Cette technique, basée sur le principe de la stéréovision, permet d'accéder aux trois composantes de la vitesse dans le plan éclairé par le laser. Les mesures ont été réalisées dans 5 plans verticaux passant par l'axe de rotation du mobile afin d'évaluer l'effet des contre-pales sur la structure de l'écoulement. L'écoulement dans ces plans est analysé en appliquant la décomposition de Reynolds qui considère qu'un champ instantané de vitesse est la superposition du champ moyen et d'un champ de fluctuation de vitesse ($u = \bar{u} + u'$). Ainsi, pour caractériser la composante moyenne de l'écoulement, les 300 champs instantanés sont moyennés tandis que pour caractériser la composante turbulente de l'écoulement, les moyennes quadratiques de fluctuation de vitesse sont calculées ($\sqrt{u'^2}$).

L'analyse des champs moyens générés par le mobile TTP 125 et EE 150 à leur vitesse de rotation N_{js} montre que les mobiles génèrent tous les deux un écoulement axial composé d'un jet et de deux boucles de recirculation et que leurs composantes comprises dans le plan vertical de mesure sont d'amplitudes similaires. Par contre, il apparaît que la composante tangentielle générée par le mobile EE 150 est deux fois plus importante que celle produite par le mobile TTP 125. La comparaison des champs moyens dans les différents plans de mesure montre que l'écoulement mixte axio-tangential généré par mobile EE 150 est significativement déformé à la proximité des contre-pales, tandis que l'écoulement majoritairement axial généré par le mobile TTP 125 présente une symétrie de révolution quasi parfaite.

La composante turbulente de l'écoulement est caractérisée sur base de l'analyse de la distribution, dans les cinq plans de mesure, de l'énergie cinétique turbulente k et de son taux

de dissipation ε . La première grandeur peut se calculer à partir des moyennes quadratiques des composantes de fluctuation de la vitesse ($k = 0.5(\overline{u'^2_x} + \overline{u'^2_y} + \overline{u'^2_z})$), à condition que la résolution spatiale des mesures P.I.V. soit assez fine que pour couvrir tout le spectre d'échelle. Cette condition a été vérifiée en comparant la résolution des mesures à la taille de l'échelle de Taylor. La deuxième grandeur (ε) est estimée en utilisant l'approche dimensionnelle basée sur la théorie de la cascade d'énergie proposée par Richardson et Kolmogorov (Pope, 2000) et qui indique que ε est liée à l'énergie cinétique turbulente k par la relation : $\varepsilon = k^{3/2} / \Lambda$, où Λ est l'échelle intégrale qui correspond à la taille des tourbillons les plus énergétiques. La répartition spatiale de l'échelle intégrale est calculée par l'intégration de la fonction d'autocorrélation R_{ii} des champs de fluctuation de vitesse mesurés par 3D P.I.V..

L'analyse des champs d'énergie cinétique turbulente et de son taux de dissipation générés par le mobile TTP 125 et EE 150 met en évidence que les mobiles génèrent des distributions spatiales similaires à leur vitesse de rotation N_{js} (ou à des multiples de celles-ci). Ces distributions sont caractérisées par des valeurs maximales ($k_{max} \cong 2.5 \times 10^{-3} \text{ m}^2 \text{ s}^{-2}$, $\varepsilon_{max} \cong 5 \times 10^{-3} \text{ m}^2 \text{ s}^{-3}$) dans la zone balayée par le mobile, dans le jet à la sortie de ses pales et dans la partie ascendante de la boucle de recirculation. Les valeurs de k et de ε sont beaucoup plus faibles dans le reste de l'écoulement ($k < 1 \times 10^{-3} \text{ m}^2 \text{ s}^{-2}$; $\varepsilon < 1 \times 10^{-3} \text{ m}^2 \text{ s}^{-3}$). Les résultats obtenus sont en bon accord avec les résultats de la littérature ainsi qu'avec des résultats déduits de grandeurs globales mesurées comme la puissance globale dissipée. Bien que conduisant à des distributions spatiales de k et de ε très similaires à N_{js} , les mobiles ont des caractéristiques intrinsèques très différentes comme le montre l'analyse des champs de k et ε rendus adimensionnels en les divisant respectivement par $(\pi N d)^2$ et $N^3 d^2$. Ces champs adimensionnels présentent en effet des distributions numériques caractérisées par des gammes de valeurs très distinctes. Par exemple, les valeurs maximales normées de k et ε valent respectivement $0.075 \pi^2 N^2 d^2$ et $5 N^3 d^2$ pour le mobile EE 150 alors qu'elles ne valent que $0.025 \pi^2 N^2 d^2$ et $0.6 N^3 d^2$ pour le mobile TTP 125.

Les contraintes mécaniques au sein de l'écoulement sont caractérisés par les composantes du tenseur de Reynolds ($\tau_{ij} = \rho_i \overline{u'_i u'_j}$). Deux types de contraintes apparaissent dans ce tenseur : les contraintes normales ($i = j$) et les contraintes de cisaillement ($i \neq j$). L'analyse des distributions spatiales des composantes du tenseur de Reynolds montre que les deux types de contraintes sont maximales dans le jet à la sortie des pales ($\tau_{ii,max} \cong 1.5 - 2 \text{ N m}^{-2}$, $\tau_{ij,max} \cong 0.2 \text{ N m}^{-2}$) et nettement plus faibles ailleurs ($\tau_{ii,max} < 0.8 \text{ N m}^{-2}$, $\tau_{ij,max} < 0.1 \text{ N m}^{-2}$). Il apparaît également que les contraintes normales sont quasiment dix fois plus élevées que les contraintes de cisaillement. Les premières jouent donc un rôle prépondérant. La moyenne des contraintes normales τ_N est calculée afin d'obtenir une seule carte qui caractérise la répartition spatiale des contraintes mécaniques.

Vu la signification physique de τ_N , il semblait évident que le découpage de la cuve en zone problématique ou non-problématique pour le développement cellulaire devait être basé sur la répartition spatiale de cette grandeur. Cependant, s'est posé le problème de l'absence dans la littérature d'une valeur seuil de τ_N pertinente dans le cas où les cellules sont cultivées sur microporteurs dans une cuve agitée. Le découpage de la cuve a donc été basé sur la répartition spatiale d'une autre grandeur qui est l'échelle de Kolmogorov λ_K et qui se calcule via la relation $\lambda_K = (\nu^3/\varepsilon)^{1/4}$. En effet, diverses études, qui ont étudié les performances de culture de cellules animales sur microporteurs en cuve agitée en fonction des conditions d'agitation, ont mis en évidence que le rapport entre l'échelle de Kolmogorov et la taille des microporteurs est un bon indicateur de l'impact potentiel du stress hydrodynamique sur le développement cellulaire. Trois *ratios*, fréquemment cités dans la littérature, ont été sélectionnés : un *ratio* de 1, un *ratio* de $\frac{2}{3}$ et un *ratio* de $\frac{1}{2}$. Le découpage de la cuve selon ces trois critères montre que plus le critère est strict (le plus strict étant le *ratio* de 1) plus la zone problématique est étendue. Il en est de même lorsque la vitesse de rotation du mobile augmente. Ainsi, à la vitesse de rotation N_{js} , la zone problématique correspond à une zone couvrant les $\frac{3}{4}$ inférieur de la cuve lorsque le *ratio* choisi vaut 1 tandis que la zone problématique est cantonnée à la zone balayée par le mobile et une faible fraction du jet lorsque le *ratio* choisi est $\frac{1}{2}$. A la vitesse de rotation $2 N_{js}$, elle correspond, par contre, à l'ensemble de la cuve si le *ratio* choisi est 1 et à une zone couvrant la zone balayée par le mobile, le jet à la sortie des pales et une partie de la boucle de recirculation supérieure lorsque le *ratio* vaut $\frac{1}{2}$.

L'ensemble des résultats obtenus dans ce chapitre montrent que pour toutes les grandeurs hydrodynamiques mesurées, une répartition spatiale non homogène est observée et que les niveaux de contraintes mécaniques existant dans certaines zones de la cuve sont potentiellement néfastes pour la croissance cellulaire. Du fait de la non-homogénéité des distributions mesurées, une cellule fixée sur un microporteur en mouvement dans l'écoulement sera soumise à un environnement hydrodynamique local très variable au cours du temps suivant ses positions successives au sein de la cuve. La caractérisation eulérienne de l'écoulement ne permet donc pas, à elle seule, d'accéder à cette succession d'environnements et d'évaluer l'effet résultant sur le métabolisme cellulaire. Pour accéder à l'histoire des environnements successifs, il est nécessaire de coupler l'approche eulérienne présentée dans ce chapitre à une approche lagrangienne présentée dans le Chapitre V. Le couplage entre les deux approches sera réalisé dans le Chapitre VI.

1 Introduction

L'étude présentée au chapitre précédent a permis de sélectionner, parmi différents designs de mobiles axiaux, les deux mobiles qui, sur base de grandeurs globales, semblent générer l'écoulement le plus adapté à la culture de cellules animales sur microporteurs en cuve agitée. En effet, comparés à cinq autres mobiles axiaux, le mobile TTP 125 (Mixel, $d/T = 0.4$) et le mobile EE 150 (Applikon, $d/T = 0.5$) génèrent, lorsqu'ils tournent à leur vitesse minimale respective de maintien en suspension complète des microporteurs N_{js} ou à des multiples de celles-ci $x N_{js}$, les plus faibles contraintes mécaniques moyennes, ces dernières étant estimées à partir de la puissance globale fournie par le moteur et dissipée dans la cuve.

Ces deux mobiles semblent donc être d'excellents candidats pour appliquer la méthodologie développée dans cette thèse et qui consiste à caractériser l'environnement hydrodynamique local rencontré par un élément de fluide en mouvement, tel qu'un microporteur, en combinant une description eulérienne à une description lagrangienne.

Ce chapitre est consacré à la première étape de la méthodologie. Il s'agit de la caractérisation eulérienne de l'écoulement turbulent généré respectivement par les mobiles TTP 125 et EE 150 au sein de la cuve de 20 L. Les résultats attendus de cette étude sont des cartes décrivant de manière quantitative la répartition spatiale :

- De la vitesse moyenne du fluide ;
- Des propriétés de l'écoulement turbulent telles que l'énergie cinétique turbulente k et son taux de dissipation ε ;
- Des contraintes mécaniques générées au sein de l'écoulement telles que les contraintes de cisaillement.

Sur base de ces cartes, la cuve sera divisée en zones caractérisées par une gamme de valeurs d'un critère défini telles que, par exemple, les contraintes de cisaillement locales. Ces cartes et le découpage de la cuve en zones seront couplés, au Chapitre VI, aux trajectoires d'une particule obtenues par l'étude lagrangienne (Chapitre V) pour obtenir des résultats du type : « Pour une vitesse d'agitation et un design de mobile donné, un microporteur perçoit en moyenne un stress hydrodynamique d'une intensité X. Il séjourne en moyenne Y secondes dans une zone caractérisée par un stress hydrodynamique d'intensité Z, ... ».

La technique 3D P.I.V. a été utilisée dans cette étude pour déterminer la répartition spatiale des grandeurs caractéristiques de l'écoulement moyen et de sa composante turbulente. Le principe de la technique 3D P.I.V. est identique à celui de la technique 2D P.I.V. à l'exception près que la technique 3D P.I.V. emploie deux caméras qui observent la même zone d'intérêt mais sous des angles de vision différents ; ce qui permet de mesurer les trois composantes des vecteurs instantanés de vitesse en tout point du plan éclairé par le laser. Afin d'étudier l'influence des contre-pales sur la structure l'écoulement, les mesures 3D P.I.V. ont été faites dans cinq plans verticaux passant par l'axe de symétrie de la cuve et formant des angles de respectivement, 9° , 27° , 45° , 63° et 89° avec le plan passant par les deux contre-pales.

Ce chapitre est divisé en quatre parties. La première partie, appelée « matériels, méthodes et validation », présente les caractéristiques du dispositif de 3D P.I.V. utilisé et montre la validité des mesures obtenues. Dans la seconde partie, les caractéristiques du champ moyen de vitesse produit par chaque mobile sont mises en évidence. L'accent est porté sur la structure des boucles de recirculation, sur l'orientation principale de l'écoulement et sur l'effet des contre-pales sur la structure locale de l'écoulement moyen. Dans la troisième partie, ce sont les caractéristiques de l'écoulement turbulent qui sont étudiées. La répartition spatiale de l'énergie cinétique turbulente k et de son taux de dissipation ε y sont décrites. La fiabilité des résultats obtenus pour la première grandeur y est discutée en montrant que la résolution spatiale des mesures est du même ordre de grandeur ou inférieure à la micro-échelle de Taylor. La seconde grandeur est estimée *via* la méthode dimensionnelle. Les résultats obtenus sont comparés aux valeurs moyennes estimées à partir de la puissance globale fournie par le moteur et dissipée dans la cuve, ainsi qu'à des mesures directes obtenues par P.I.V. à haute résolution spatiale dans le jet du mobile TTP 125 dans la même cuve (Delafosse *et al.*, 2011). Dans la dernière partie des résultats, nous nous intéressons à la répartition spatiale des grandeurs liées au stress hydrodynamique telles que les contraintes mécaniques calculées à partir du produit des composantes du tenseur de Reynolds et de la densité du fluide, ou encore, du *ratio* entre l'échelle de Kolmogorov et la taille des microporteurs. Connaissant les valeurs maximales que supporteraient, d'après la littérature, les cellules fixées aux microporteurs et la répartition spatiale de ces grandeurs dans l'écoulement, la cuve sera divisée en zones suivant leur caractère plus ou moins problématique pour la viabilité des cellules animales.

2 Appareils, méthodes et validation

2.1 3D P.I.V.

2.1.1 Principe de la technique

Comme indiqué au Chapitre II, l'axe optique de la caméra CCD est perpendiculaire au plan éclairé par le laser lorsque l'on réalise des mesures 2D P.I.V.. Dès lors, cette technique ne mesure pas directement le vecteur de vitesse 3D mais sa projection 2D sur le plan de mesure. En effet, la technique 2D P.I.V. ne mesure que le déplacement Δx et Δy des particules dans ce plan (Figure III-1) et donc les composantes u_x et u_y de la vitesse. Le déplacement Δz perpendiculaire au plan du laser est inconnu ainsi que la composante u_z de la vitesse.

La stéréo P.I.V. ou 3D P.I.V. permet de pallier cette limitation de la 2D P.I.V. en estimant le déplacement des particules dans la direction perpendiculaire au plan éclairé par le laser. Le principe de la 3D P.I.V. est le même que celui de la vision humaine : la stéréovision. Pour voir en 3D, l'être humain a besoin de deux yeux, qui observent un objet selon des angles légèrement différents, et de son cerveau pour analyser l'information. Suivant la même logique, la stéréo P.I.V. utilise deux caméras CDD observant l'écoulement sous des angles différents (Figure III-2, angles α et β) et un traitement de reconstruction.

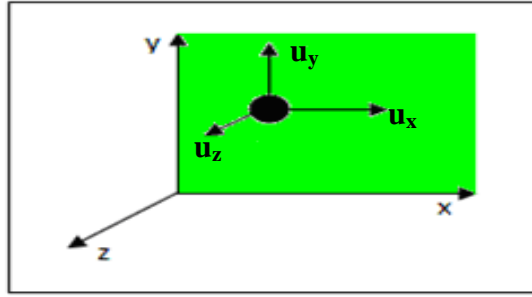


Figure III-1 : Choix de l'orientation des axes et des composantes de la vitesse par rapport à la position du plan éclairé par le laser (représenté par le cadre vert ci-dessus).

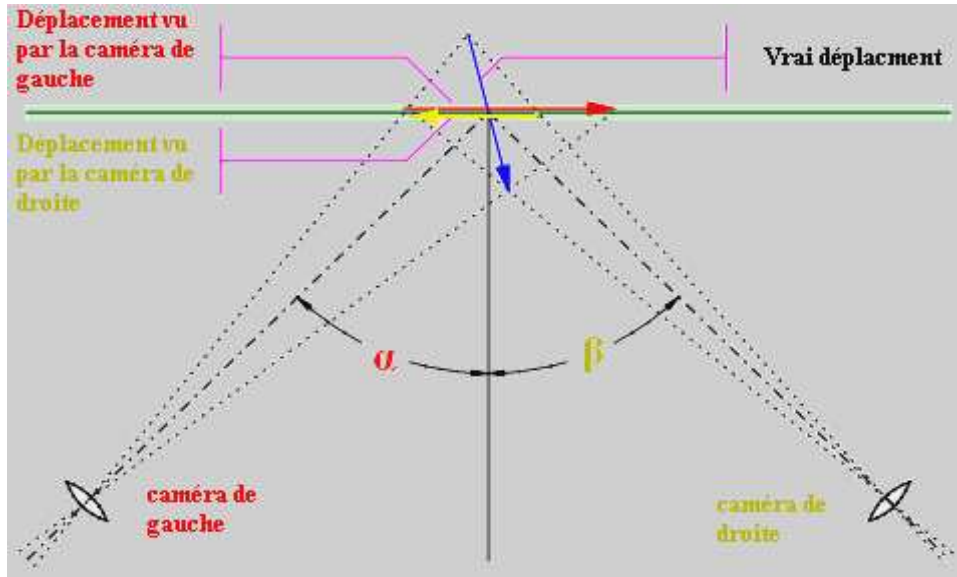


Figure III-2 : Reconstruction du vecteur 3D à partir de ces deux projections dans le plan éclairé par le laser et mesuré par chaque caméra.

Tout comme en 2D P.I.V., la source laser plan génère des impulsions lumineuses décalées dans le temps d'un intervalle Δt . Les deux caméras enregistrent dans des doublets d'images la position initiale et finale des particules présentes dans le plan éclairé par le laser. Par le traitement de corrélation croisée décrit au Chapitre II, on obtient pour chaque caméra et selon son orientation la projection du vecteur 3D dans le plan éclairé par le laser. Ces deux projections sont représentées par les flèches jaune et rouge sur la Figure III-2 qui schématise le dispositif expérimental vu du dessus. Si l'orientation et l'éloignement des caméras par rapport au plan du laser sont connus, le vecteur 3D peut être déterminé à partir des deux projections par reconstruction géométrique, comme illustré sur la Figure III-2.

Pour déterminer l'orientation et l'éloignement des caméras par rapport au plan du laser, une calibration est réalisée. Une mire de calibration est disposée au sein de l'écoulement et alignée avec le plan éclairé par le laser. Cette calibration permet d'établir la relation mathématique qui existe entre les coordonnées spatiales (X, Y, Z en m) des points situés dans le plan éclairé par le laser et leurs coordonnées (x, y en pixels) dans les images acquises par chaque caméra. Deux mires ont été utilisées dans le cadre de ce travail (Figure III-3). La première est composée d'un plateau blanc de forme carrée de 20 cm de côté. Des points noirs espacés de 5 mm couvrent l'ensemble de la surface de la mire. Leur diamètre vaut 0.5 mm à

l'exception du point central et des 4 points situés de part et d'autre de celui-ci dont les diamètres valent respectivement 1.2 mm et 0.4 mm. La deuxième mire a les mêmes caractéristiques géométriques que la première sauf que les couleurs sont inversées et que son coin inférieur droit est rogné pour épouser la forme hémisphérique du fond de la cuve utilisée dans ce travail.

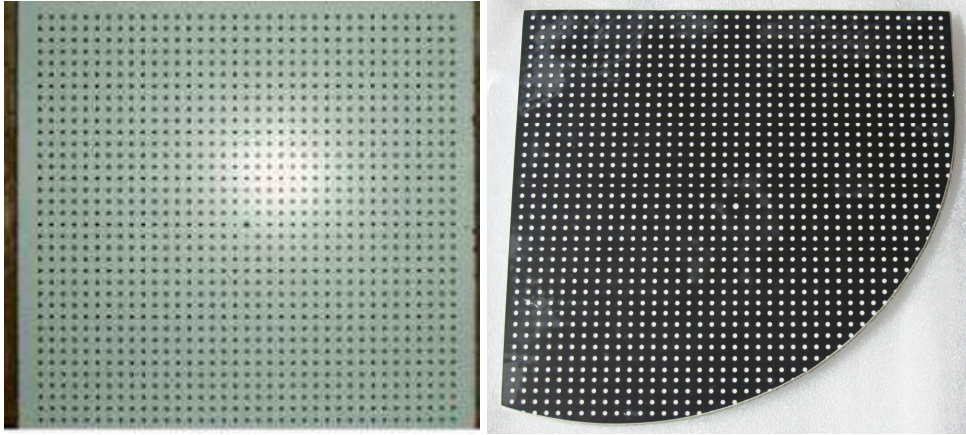


Figure III-3 : Mires de calibration utilisées lors des mesures 3D P.I.V.

Chacune des mires est alignée avec le plan éclairé par le laser et disposée au milieu de l'épaisseur du faisceau. Elles sont ensuite déplacées en quatre autres positions dans la direction perpendiculaire au plan éclairé par le laser à l'aide d'un système de traverse micrométrique afin de couvrir toute l'épaisseur du faisceau laser. Pour chacune de ces positions, l'image de la mire est acquise par chaque caméra. La position en pixels des points de la mire dans chaque image est extraite et analysée par le logiciel Dynamic studio (version 2.30) pour ajuster des paramètres géométriques d'un modèle de calibration de type « pinhole ». Ces paramètres sont les éléments d'un vecteur de translation et d'une matrice de rotation qui positionnent la caméra par rapport au plan du laser mais également un facteur d'échelle et les paramètres d'un modèle qui tient compte des déformations introduites par la lentille. Les équations de ce modèle de type « pinhole » sont présentées en détails dans le Chapitre V. Cette procédure permet ainsi de déterminer la relation mathématique qui existe entre les coordonnées spatiales des points de la mire et leur position en pixels dans l'image. Si la mire est parfaitement alignée avec le plan éclairé par le laser et placée au centre de son épaisseur, on obtient pour chaque caméra les informations nécessaires pour pouvoir reconstruire les vecteurs 3D à partir de leurs projections. Cependant, en pratique, la mire n'est jamais parfaitement placée et une étape supplémentaire est nécessaire pour obtenir les informations recherchées. Cette étape consiste à enregistrer pour chaque caméra simultanément une image contenant les positions en pixels des particules fluorescentes excitées par la lumière du laser. À l'aide du modèle « pinhole » de chaque caméra, ces particules sont repositionnées dans l'espace. Les positions des particules obtenues pour chaque caméra sont comparées. Les paramètres des deux modèles « pinhole » sont ajustés jusqu'à ce que les positions des particules coïncident.

2.1.2 Conditions d'acquisition des mesures 3D P.I.V.

Comme le dispositif 2D P.I.V., le dispositif 3D P.I.V. est commercialisé par la société Dantec Dynamics Studio (Danemark). Il s'agit en fait d'une modernisation de l'installation 2D P.I.V. qui a été réalisée en janvier 2009.

Le laser, les particules traçantes et les deux caméras¹ ont été conservés. Leur description se trouve dans la Section 2.3 du Chapitre II. Pour permettre l'acquisition en vision stéréoscopique, les caméras ont été disposées à l'extrémité d'un profilé en aluminium d'un mètre de long. Les caméras sont fixées sur des montures de Scheimpflug (Figure III-4), qui permettent de créer un décalage angulaire entre le capteur de la caméra et sa lentille. Ce décalage est nécessaire pour que l'ensemble de l'image puisse être net malgré l'inclinaison importante de l'axe optique de la caméra par rapport au plan du laser. Lors de la campagne de mesure, un décalage de 1.5° a été appliqué entre le capteur de la caméra et la lentille. Les axes optiques de deux caméras formaient un angle de 40° .

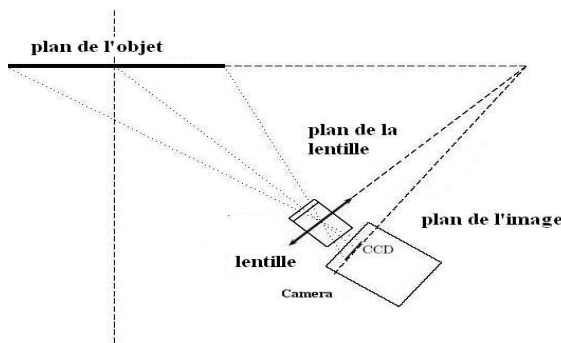


Figure III-4 : Montures de Scheimpflug.



Figure III-5 : Boîtier de synchronisation et station de calcul Dell.

La chaîne d'acquisition des données a été totalement remplacée lors de la modernisation de l'installation. Le processeur corrélateur en temps réel 2500 a été remplacé par un boîtier électronique de la marque National Instrument (Figure III-5) qui synchronise les impulsions électriques envoyées au laser et aux caméras et par une station de calcul de la marque Dell qui enregistre les images acquises par les caméras. Un nouveau logiciel, appelé Dynamic Studio (Dantec Dynamic S.A., v.3.00), a été installé sur cet ordinateur pour traiter les images et calculer les champs de vitesse.

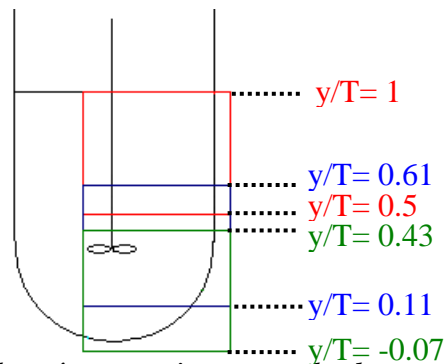


Figure III-6 : Zones observées successivement par les deux caméras

Afin que la résolution spatiale des champs de vitesse soit la plus fine possible, les mesures P.I.V. ont à nouveau été réalisées, uniquement dans la moitié droite de la cuve qui est éclairée

¹ Le laboratoire de Génie Chimique disposait déjà de deux caméras pour réaliser des mesures 2D P.I.V. diphasiques dans une colonne à bulles.

par le faisceau plan du laser. L'acquisition des mesures sur l'ensemble de la hauteur de la cuve est réalisée en trois étapes. Les zones successivement observées par les caméras sont schématisées par les cadres rouge, bleu et vert dans la Figure III-6.

Pour encore affiner la résolution spatiale des mesures, le traitement de corrélation « simple » a été remplacé par un traitement de corrélation croisée adaptative lors du calcul des projections des vecteurs 3D dans le plan éclairé par le laser à partir des doublets d'images acquises par chaque caméra. Tout comme la corrélation croisée « simple », la corrélation croisée adaptative détermine le déplacement moyen des particules dans des petites zones de l'image à l'aide d'un traitement de signal en transformée de Fourier. Elle diffère par le fait qu'une procédure itérative est employée, ce qui permet de réduire la taille des fenêtres d'interrogation (et donc d'affiner la résolution) tout en maintenant un bon *ratio* signal sur bruit. L'algorithme employé par la corrélation croisée adaptative est le suivant : lors de la première étape, le déplacement moyen des particules est déterminé *via* les mêmes traitements que la corrélation croisée « simple » dans de grandes fenêtres d'interrogation (dans cette étude: 64×64 pixels²). Lors de la seconde étape, la taille des fenêtres d'interrogations est divisée par deux (32×32 pixels²), ce qui entraîne une diminution inévitable du nombre de particules par fenêtre d'interrogation et une augmentation du risque que ces particules ne soient pas présentes dans la zone d'interrogation pour une des deux images du doublet, diminuant ainsi le *ratio* signal sur bruit. Pour pallier cela, les zones d'interrogation de la deuxième image du doublet sont décalées dans l'espace, par rapport à celles de la première image, d'une distance correspondant au champ de vitesse estimé à la première étape de l'algorithme itératif (Figure III-7). Cette astuce permet de récupérer les particules qui seraient sorties de la zone d'interrogation si cette dernière n'avait pas été décalée dans l'espace. Elle permet ainsi de maintenir un bon *ratio* signal sur bruit. Cette opération est répétée jusqu'à ce que la taille des fenêtres d'interrogation souhaitée soit atteinte. Dans la présente étude, la taille finale des fenêtres d'interrogation est de 16×16 pixels² et la résolution spatiale des mesures 3D P.I.V. est de 1.25 mm ; ce qui la divise par deux par rapport aux mesures 2D P.I.V. réalisées au Chapitre II (2.6 mm)

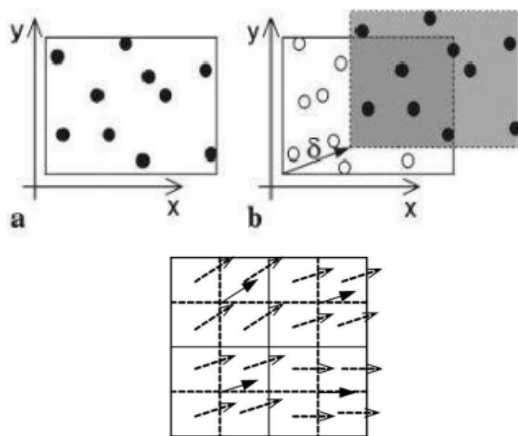


Figure III-7 : Illustration de l'algorithme de traitement de la corrélation croisée adaptative .

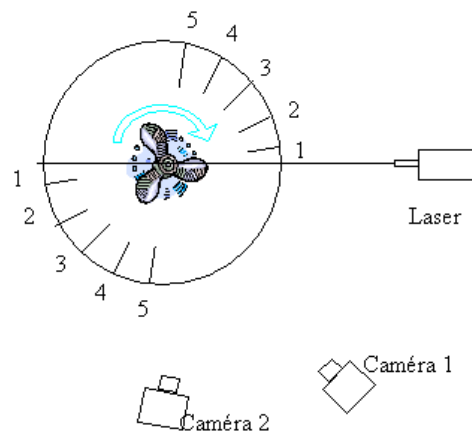


Figure III-8 : Position des contre-pales vis-à-vis du plan de mesure.

Comme cela a été mentionné brièvement dans l'introduction de ce chapitre, les mesures 3D P.I.V. ont été réalisées dans 5 plans verticaux afin d'évaluer l'influence des contre-pales sur la structure de l'écoulement moyen et turbulent. Les plans forment respectivement un angle de 9° (cp1), 27° (cp2), 45° (cp3), 63° (cp4) et 89° (cp5) avec le plan passant par les deux contre-pales (Figure III-8). Les mesures 3D P.I.V. ont également été réalisées à diverses vitesses de rotation pour chaque mobile afin de vérifier le caractère turbulent de l'écoulement. Ce caractère a de nouveau été observé. Comme le caractère turbulent de l'écoulement a été discuté en détails dans l'Annexe 2 du Chapitre II, nous ne reviendrons pas sur cet aspect dans ce chapitre. Dans les sections qui suivent, les résultats seront généralement présentés de manière adimensionnelle sauf lorsque l'on souhaite comparer les performances des deux mobiles étudiés. Dans ce cas, les résultats seront présentés pour la vitesse de rotation minimale de maintien des microporteurs en suspension complète N_{js} .

Le diagramme ci-dessous (Figure III-9) résume l'ensemble des opérations réalisées pour obtenir les champs instantanés et moyens de vitesse 3D.

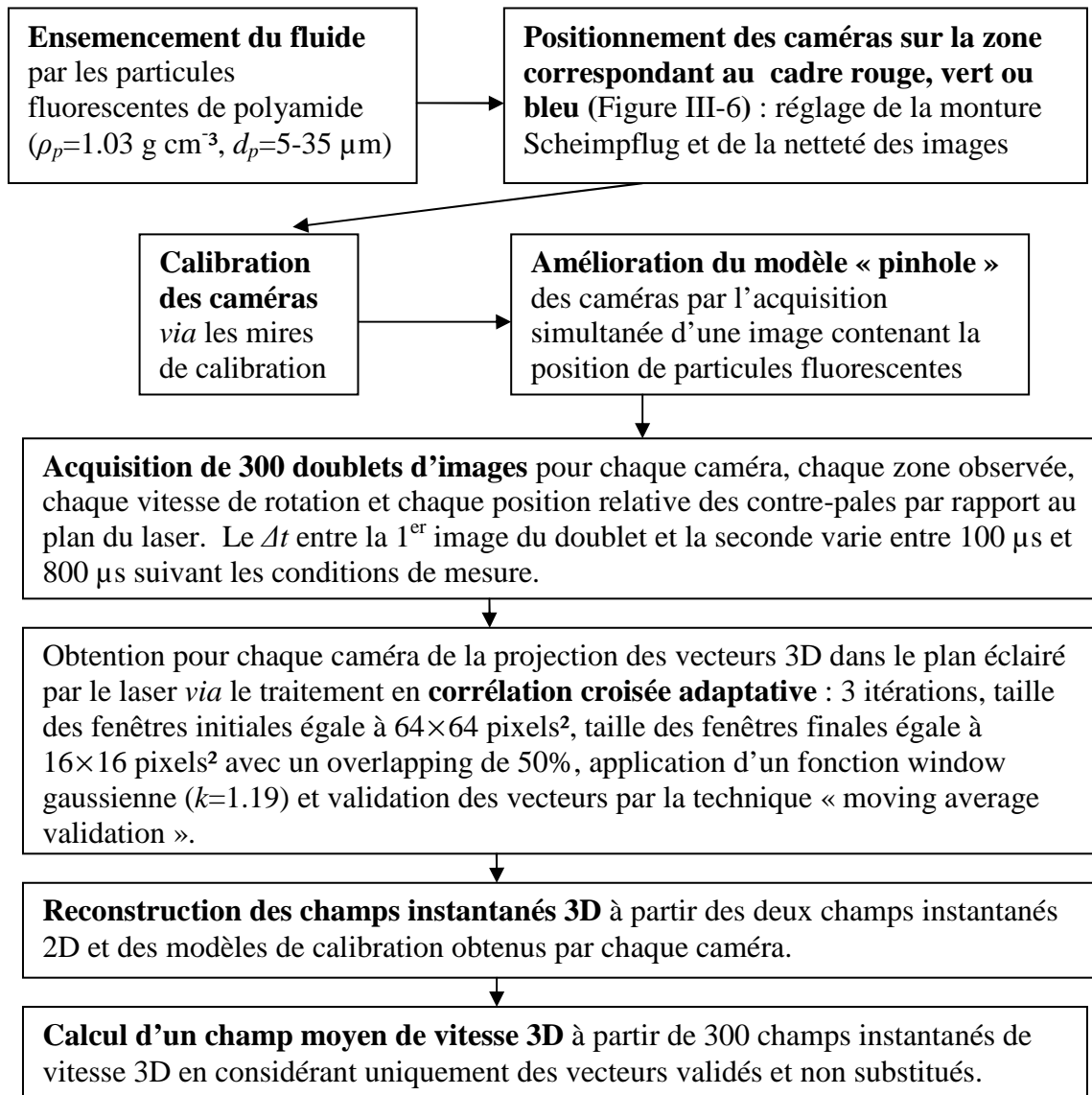


Figure III-9 : Ensemble des traitements appliqués sur les mesures 3D P.I.V.

2.2 Validation des mesures 3D P.I.V.

En 3D-P.I.V., les composantes u_x , u_y , u_z du vecteur de la vitesse ne sont pas directement mesurées. Elles sont estimées en combinant géométriquement leurs deux projections dans le plan du laser respectivement mesurées par les deux caméras (Figure III-2). Dès lors, une mauvaise estimation de l'orientation des caméras (*i.e.* une calibration imprécise) peut avoir un impact important sur le résultat obtenu. Il convient donc de le valider.

Puisqu'en 2D P.I.V. ce problème de reconstruction n'est pas rencontré et que l'on mesure de manière fiable deux des trois composantes du vecteur de vitesse, les résultats de 3D P.I.V. sont validés par comparaison avec des mesures 2D P.I.V. Nous avons en effet à notre disposition :

- Les mesures 2D P.I.V. présentées au chapitre précédent. Pour rappel, ces mesures sont réalisées dans le plan vertical qui passe par l'axe d'agitation et qui forme un angle de 45° avec le plan passant par les deux contre-pales. La résolution spatiale de ces mesures est de 2.5 mm ;
- Des mesures 2D P.I.V. dans un plan horizontal et dans un plan tangentiel encadrant les pales du mobile TTP 125. Ces mesures ont été réalisées (Delafosse *et al.*, 2011) dans le cadre d'une étude qui avait pour objectif d'étudier l'effet de la résolution spatiale des mesures sur l'estimation du taux de dissipation de l'énergie cinétique turbulente ε par la méthode directe. Nous reviendrons sur cette étude plus en détails au Point 4.2 ci-après ;
Le plan horizontal se situe à 90 mm du fond de la cuve. Il coupe le mobile TTP 125 au niveau de sa cassure inférieure indiquée par la ligne verte sur la Figure III-10 ci-dessous. Le plan tangentiel se situe à 62.5 mm du centre de l'axe d'agitation, *i.e.* il est tangent à l'extrémité du mobile (Figure III-11). Les résolutions spatiales de ces mesures sont respectivement égales à 1.20 mm et 0.469 mm .

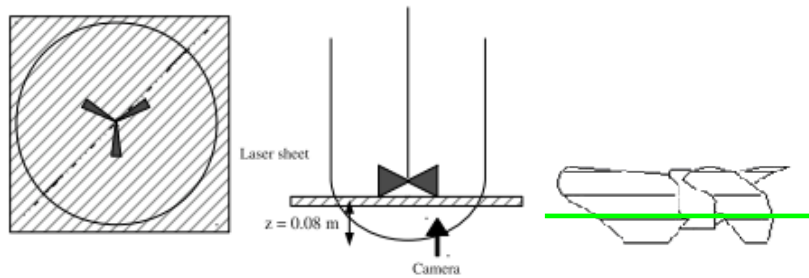


Figure III-10 : Position du plan de mesure horizontal x-z (Delafosse *et al.*, 2011)

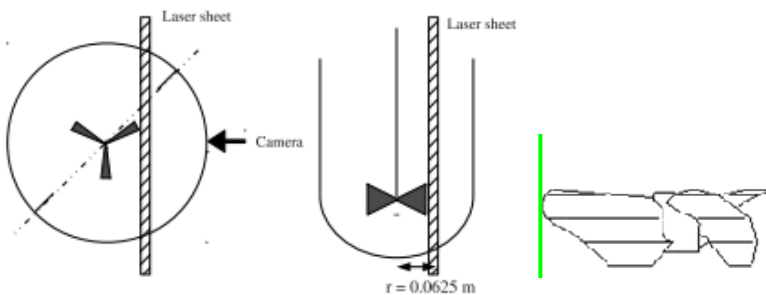


Figure III-11 : Position du plan de mesure tangentiel y-z (Delafosse *et al.*, 2011)

Naturellement, il n'est possible de comparer des mesures 2D P.I.V. et 3D P.I.V. que sur base de grandeurs moyennes. Ces grandeurs sont les composantes de la vitesse moyennée sur le temps $\overline{u_x}$, $\overline{u_y}$, $\overline{u_z}$, mais également, les moyennes quadratiques des composantes de fluctuation de vitesse $\sqrt{\overline{u_x'^2}}$, $\sqrt{\overline{u_y'^2}}$, $\sqrt{\overline{u_z'^2}}$, ainsi que la moyenne temporelle de leur produit croisé, $\overline{u_x' u_y'}$, $\overline{u_x' u_z'}$, $\overline{u_y' u_z'}$. Pour rappel, ces six dernières grandeurs sont obtenues en appliquant la décomposition de Reynolds sur les champs de vitesse (Section 2.1, Chapitre I). Les mesures 2D P.I.V. présentées dans le chapitre précédent permettent de valider, pour les deux mobiles, les composantes $\overline{u_x}$, $\overline{u_y}$, $\sqrt{\overline{u_x'^2}}$, $\sqrt{\overline{u_y'^2}}$, $\overline{u_x' u_y'}$ dans l'ensemble du plan vertical. Les mesures 2D P.I.V. dans le plan horizontal et tangentiel permettent la validation des composantes $\overline{u_x}$, $\overline{u_z}$, $\sqrt{\overline{u_x'^2}}$, $\sqrt{\overline{u_z'^2}}$, $\overline{u_x' u_z'}$ et $\overline{u_y}$, $\overline{u_z}$, $\sqrt{\overline{u_y'^2}}$, $\sqrt{\overline{u_z'^2}}$, $\overline{u_y' u_z'}$, respectivement. Cependant, dans ce cas, la comparaison n'est possible que pour le mobile TTP 125 et le long de la ligne correspondant à l'intersection du plan horizontal ou tangentiel avec le plan vertical.

Pour limiter le nombre de figures nécessaires pour illustrer nos propos et puisque les mêmes conclusions sont obtenues pour les deux mobiles, nous validerons uniquement dans cette section les champs de vitesse générés par le mobile TTP 125. Les résultats relatifs au mobile EE 150 sont reportés en Annexe III-1 de ce chapitre.

Les composantes $\overline{u_x}$, $\overline{u_y}$, $\overline{u_z}$ de la vitesse moyenne estimées par 3D P.I.V. peuvent être considérées comme validées car leurs profils sont en excellent accord avec les profils mesurés par 2D. P.I.V. Les Figures III-12 à III-17 illustrent ces propos. Elles comparent

- Les profils axiaux des composantes radiale $\overline{u_x}$ et axiale $\overline{u_y}$ de la vitesse moyenne mesurés par 3D P.I.V. et 2D P.I.V. dans l'ensemble du plan vertical (Figures III-12 à III-13) ;
- Les profils radiaux des composantes radiale $\overline{u_x}$ et tangentielle $\overline{u_z}$ de la vitesse moyenne mesurés par 3D P.I.V. et 2D. P.I.V. le long de la droite correspondant à l'intersection du plan vertical et du le plan horizontal (Figures III-14 à III-15) ;
- Les profils axiaux des composantes axiale $\overline{u_y}$ et tangentielle $\overline{u_z}$ de la vitesse moyenne mesurés par 3D P.I.V. et 2D. P.I.V. le long de la droite correspondant à l'intersection du plan vertical et du plan tangentiel (Figures III-16 à III-17).

Les Figures III-12 à III-17 appellent trois commentaires. Premièrement, les résultats présentés sont adimensionnels; les composantes de la vitesse moyenne ont été normées par la vitesse en bout de pale. Deuxièmement, le choix des axes \vec{x} , \vec{y} et \vec{z} sur les figures ci-dessous indiquent que le zéro du système de référence se trouve au centre de l'axe de rotation du mobile, à la surface libre du liquide. Les axes \vec{x} et \vec{y} sont coplanaires au plan éclairé par le laser et l'axe \vec{z} est perpendiculaire à ce dernier. Enfin, les zones où les profils sont discontinus correspondent aux zones situées hors de la cuve ou à la zone balayée par le mobile où un masque est appliqué sur les mesures P.I.V.

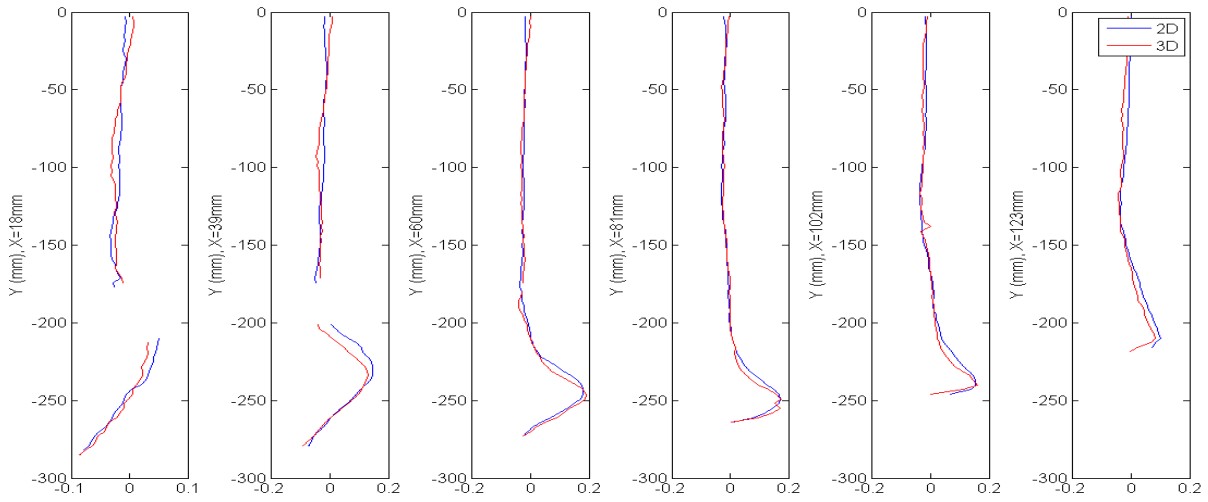


Figure III-12 : Comparaison des profils axiaux de la composante radiale adimensionnelle $\overline{u_x} / \pi N d$ de la vitesse moyenne : mobile TTP 125, mesures 2D P.I.V. (bleu) et 3D P.I.V. (rouge) dans le plan vertical.

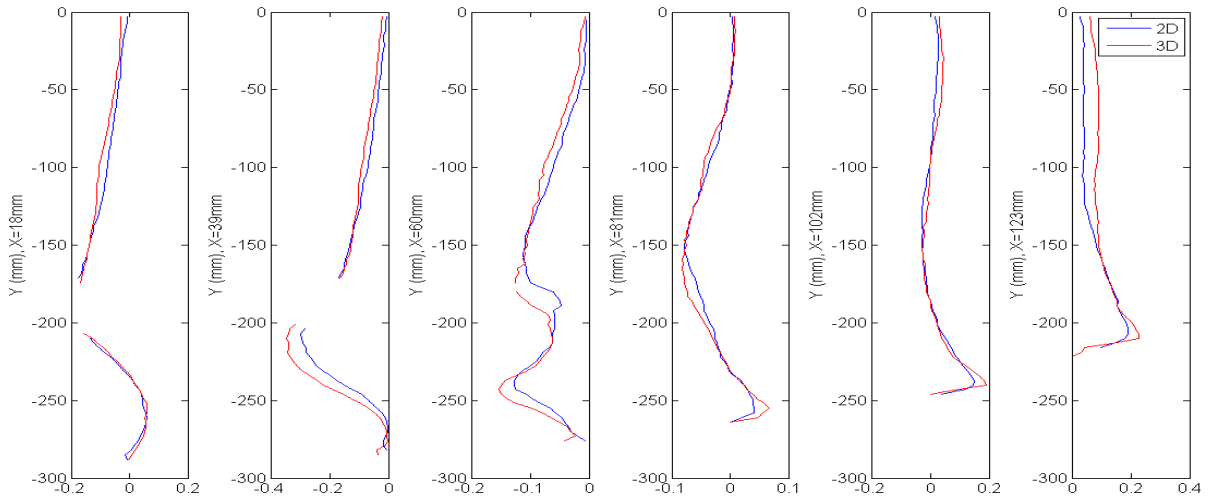


Figure III-13 : Comparaison des profils axiaux de la composante axiale adimensionnelle $\overline{u_y} / \pi N d$ de la vitesse moyenne : mobile TTP 125, mesures 2D P.I.V. (bleu) et 3D P.I.V. (rouge) dans le plan vertical.

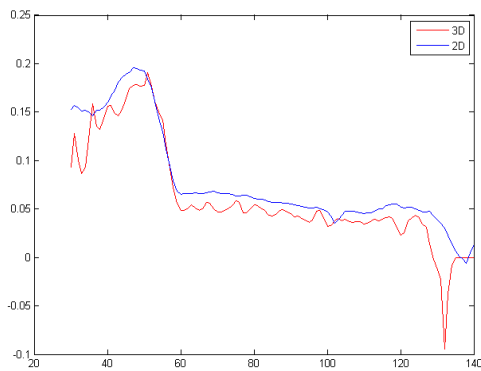


Figure III-14 : Comparaison des profils radiaux de la composante radiale adimensionnelle $\overline{u_x} / \pi N d$ de la vitesse moyenne : mobile TTP 125, mesures 2D P.I.V. (bleu) dans le plan horizontal ($y = -220$ mm) et 3D P.I.V. (rouge) dans le plan vertical.

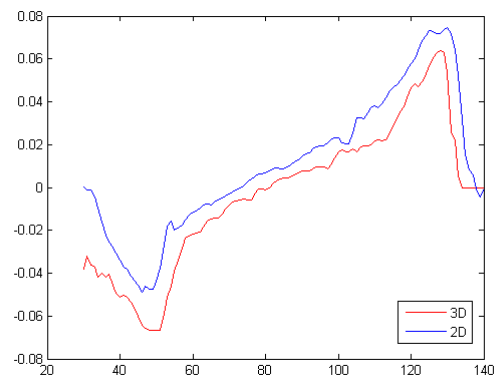


Figure III-15 : Comparaison des profils radiaux de la composante tangentielle adimensionnelle $\overline{u_z} / \pi N d$ de la vitesse moyenne : mobile TTP 125, mesures 2D P.I.V. (bleu) dans le plan horizontal ($y = -220$ mm) et 3D P.I.V. (rouge) dans le plan vertical.

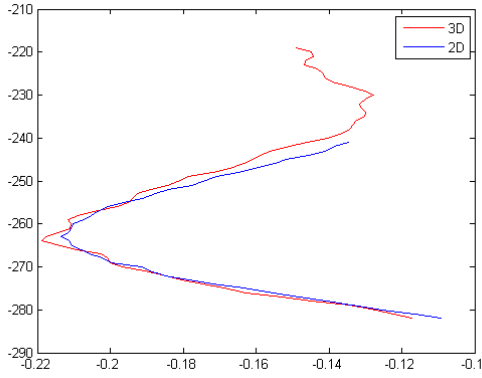


Figure III-16 : Comparaison des profils axiaux de la composante axiale adimensionnelle $\overline{u_y} / \pi N d$ de la vitesse moyenne : mobile TTP 125, mesures 2D P.I.V. (bleu) dans le plan tangentiel ($r=62.5$ mm) et 3D P.I.V. (rouge) dans le plan vertical.

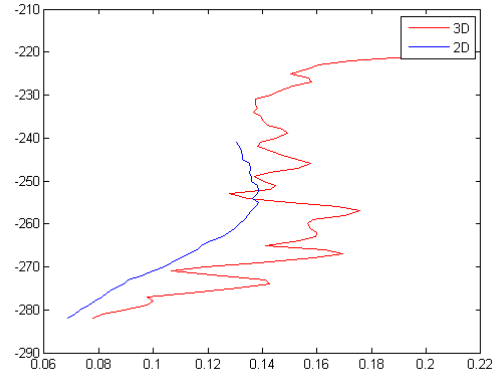


Figure III-17 : Comparaison des profils radiaux de la composante tangentielle adimensionnelle $\overline{u_z} / \pi N d$ de la vitesse moyenne : mobile TTP 125, mesures 2D P.I.V. (bleu) dans le plan tangentiel ($r=62.5$ mm) 3D P.I.V. (rouge) dans le plan vertical.

Les mesures 2D P.I.V. permettent également la validation des moyennes quadratiques des composantes de fluctuation de vitesse comprise dans le plan vertical du laser ($\sqrt{u_x'^2}, \sqrt{u_y'^2}$) ainsi que la moyenne temporelle de leur produit croisé $\overline{u'_x u'_y}$. Les Figures III-18 à III-20 illustrent ces propos. Elles comparent les profils axiaux de ces trois grandeurs estimées par 3D P.I.V. et mesurées par 2D P.I.V. dans l'ensemble du plan vertical. Un excellent accord est observé. De nouveau, les résultats sont présentés de manière normée.

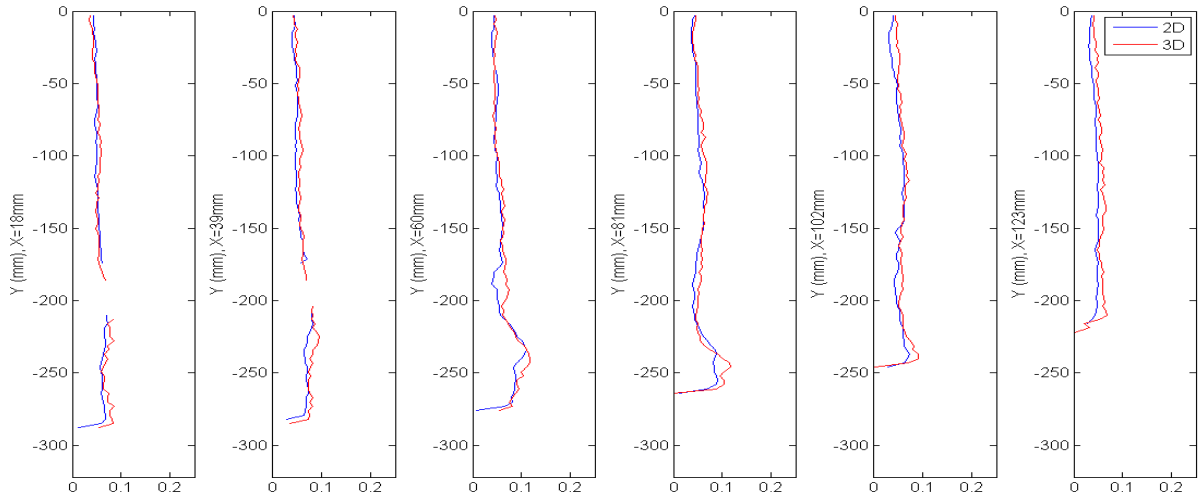


Figure III-18 : Comparaison des profils axiaux de la composante radiale adimensionnelle $\sqrt{u_x'^2} / \pi N d$ de la moyenne quadratique de fluctuation de vitesse : mobile TTP 125, mesures 2D P.I.V. (bleu) et 3D P.I.V. (rouge) dans le plan vertical.

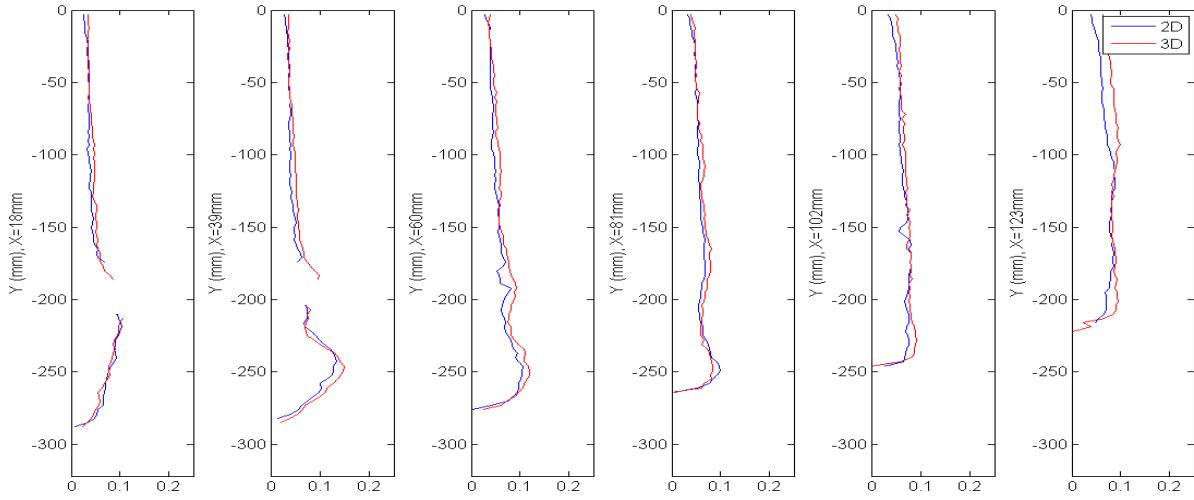


Figure III-19 : Comparaison des profils axiaux de la composante axiale adimensionnelle $\sqrt{u_y'^2} / \pi N d$ de la moyenne quadratique de fluctuation de vitesse : mobile TTP 125, mesures 2D P.I.V. (bleu) et 3D P.I.V. (rouge) dans le plan vertical.

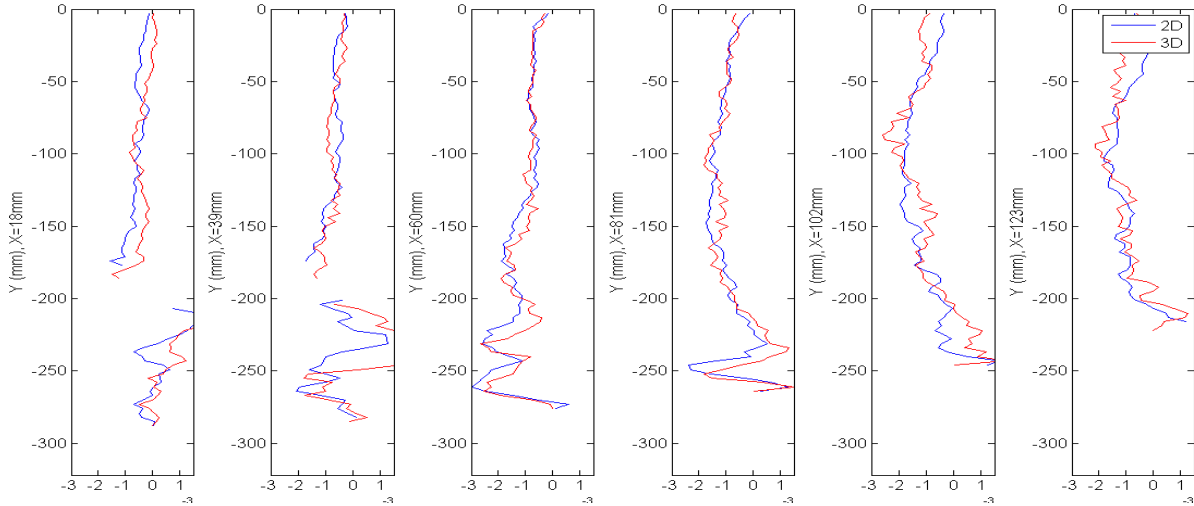


Figure III-20 : Comparaison des profils axiaux de la moyenne temporelle du produit croisé des composantes radiale et axiale de fluctuation de la vitesse $\overline{u_x' u_y'} / (\pi N d)^2$: mobile TTP 125, mesures 2D P.I.V. (bleu) et 3D P.I.V. (rouge) dans le plan vertical.

Par contre, la comparaison des résultats 2D P.I.V. et 3D P.I.V. le long des droites correspondant respectivement à l'intersection du plan vertical avec le plan horizontal et le plan tangentiel met en évidence une surestimation de la moyenne quadratique de la composante tangentielle $\sqrt{u_z'^2}$ de fluctuation de la vitesse. Les Figures III-21 et III-23 montrent effectivement que les valeurs mesurées par 3D P.I.V. sont doubles de celles mesurées par 2D P.I.V. La moyenne quadratique de la composante tangentielle $\sqrt{u_z'^2}$ ne peut donc pas être validée.

Cependant, dans toutes les études qui quantifient la répartition spatiale de l'énergie cinétique turbulente k (Eq III-1) sur base de mesures 2D P.I.V., les auteurs font appel à une hypothèse d'« isotropie » pour estimer k à partir de deux composantes de la vitesse uniquement (Eq. III-4). Cette hypothèse consiste à supposer que les moyennes quadratiques des trois

composantes fluctuantes de la vitesse sont égales (Equation III-2). Le terme $\overline{u_z'^2}$ peut donc être estimé par la Relation III-3 :

$$k = \frac{1}{2} (\overline{u_x'^2} + \overline{u_y'^2} + \overline{u_z'^2}) \quad (\text{III-1})$$

$$\overline{u_x'^2} = \overline{u_y'^2} = \overline{u_z'^2} \quad (\text{III-2})$$

$$\overline{u_z'^2} = \frac{1}{2} (\overline{u_x'^2} + \overline{u_y'^2}) \quad (\text{III-3})$$

$$k = \frac{3}{4} (\overline{u_x'^2} + \overline{u_y'^2}) \quad (\text{III-4})$$

Chung *et al.* (2007) valide cette hypothèse d'« isotropie » sur base de mesures 2D P.I.V réalisées dans un plan vertical et dans 45 plans horizontaux d'une cuve cylindrique à fond plat de 45 mm de hauteur et de diamètre. Ce plan d'expériences leur permet de mesurer directement les moyennes quadratiques des trois composantes de fluctuation de la vitesse le long de droites horizontales espacées de 1 mm et appartenant au plan vertical. Les auteurs montrent que l'estimation de l'énergie cinétique turbulente k par la Relation III-1 ou III-4 donne des résultats quasi-identiques et que dès lors la Relation III-3 est un bon moyen pour estimer le carré de la moyenne quadratique de la composante tangentielle de la fluctuation de la vitesse lorsque l'on n'a pas accès à cette grandeur ou que le résultat obtenu est incertain.

Nous avons calculé $\sqrt{\overline{u_z'^2}}$ à l'aide de la Relation III-3 dans le plan vertical et comparé le résultat obtenu le long des droites correspondant à l'intersection de ce plan avec le plan horizontal et tangentiel (courbe noir dans les Figures III-21 et III-23). L'ordre de grandeur observé est égal à celui mesuré en 2D P.I.V. La forme des profils présentent une certaine similitude. Dès lors, dans tous les calculs faisant intervenir $\sqrt{\overline{u_z'^2}}$, cette dernière sera évaluée par la Relation III-3.

Un problème d'estimation de la composante tangentielle u_z de la vitesse instantanée à forcément un impact sur l'estimation de la moyenne temporelle du produit croisé des fluctuations de vitesse dans lequel il intervient. Les Figures III-22 et III-24 confirment ces propos. Ces figures montrent effectivement que les profils obtenus par les mesures 2D P.I.V et 3D P.I.V. ne correspondent pas. La littérature n'offre pas de solution de rechange évidente dans ce cas. Nous reviendrons plus en détails sur ce point dans la Section 5.1 dans laquelle les contraintes de cisaillement sont caractérisées *via* ces produits croisés.

En synthèse, les résultats présentés dans cette section montrent que les champs moyens ($\overline{u_x}$, $\overline{u_y}$, $\overline{u_z}$), ainsi que la répartition spatiale des moyennes quadratiques des composantes de la fluctuation de la vitesse comprises dans le plan de mesures ($\sqrt{\overline{u_x'^2}}$, $\sqrt{\overline{u_y'^2}}$, $\overline{u_x' u_y'}$) mesurés par 3D P.I.V. sont fiables. La moyenne quadratique de la composante de la fluctuation de la vitesse normale au plan de mesures, $\sqrt{\overline{u_z'^2}}$, n'est pas mesurée de manière fiable et il est préférable de l'estimer sur base de l'hypothèse d'« isotropie » par la Relation III-3.

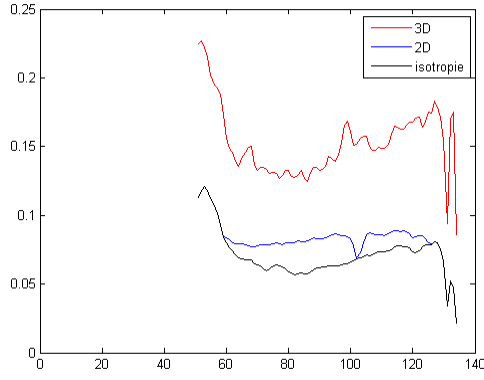


Figure III-21 : Comparaison des profils radiaux de la composante radiale adimensionnelle $\sqrt{u_y'^2} / \pi N d$ de la moyenne quadratique de fluctuation de vitesse : mobile TTP 125, mesures 2D P.I.V. (bleu) dans le plan horizontal ($y=-220$ mm), 3D P.I.V. (rouge) dans le plan vertical, Relation d'isotropie III-3 (noir) dans le plan vertical.

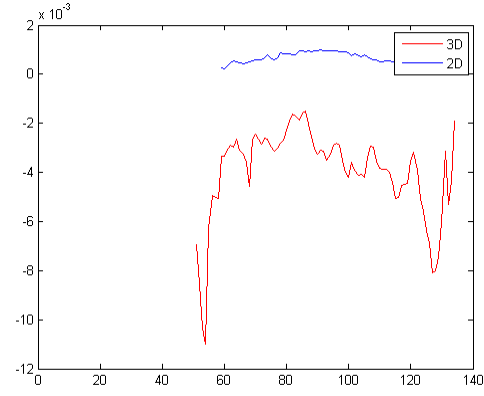


Figure III-22 : Comparaison des profils radiaux de la moyenne temporelle du produit croisé des composantes radiale et tangentielle de la fluctuation de la vitesse $\overline{u'_x u'_z} / (\pi N d)^2$: mobile TTP 125, mesures 2D P.I.V. (bleu) dans le plan horizontal et 3D P.I.V. (rouge) dans le plan vertical.

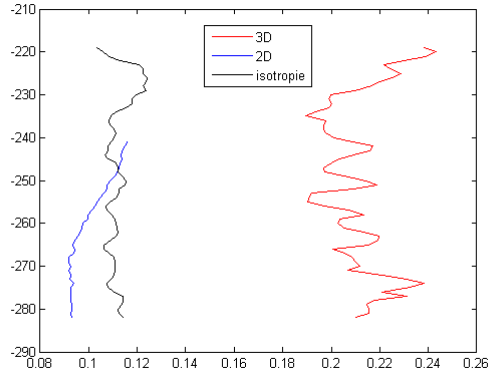


Figure III-23 : Comparaison des profils axiaux de la composante axiale adimensionnelle $\sqrt{u_x'^2} / \pi N d$ de la moyenne quadratique de fluctuation de vitesse : mobile TTP 125, mesures 2D P.I.V. (bleu) dans le plan tangentiel ($x=67.5$ mm), 3D P.I.V. (rouge) dans le plan vertical, Relation d'isotropie III-3 (noir) dans le plan vertical.

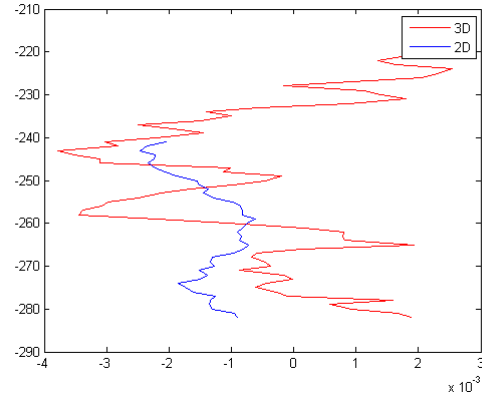


Figure III-24 : Comparaison des profils axiaux de la moyenne temporelle du produit croisé des composantes axiale et tangentielle de la fluctuation de la vitesse $\overline{u'_y u'_z} / (\pi N d)^2$: mobile TTP 125, mesures 2D P.I.V. (bleu) dans le plan tangentiel et 3D P.I.V. (rouge) dans le plan vertical.

3 Caractérisation de la composante moyenne de l'écoulement

Comme expliqué en détails dans le Chapitre I, pour décrire un écoulement turbulent, il faut le décomposer en une composante moyennée sur le temps et une composante fluctuante (décomposition de Reynolds):

$$u(x, y, z, t) = \overline{u}(x, y, z) + u'(x, y, z, t) \quad (III-5)$$

Dans cette section, nous allons nous intéresser à la structure de l'écoulement moyen généré par les mobiles TTP 125 et EE 150. Le but est de décrire qualitativement et quantitativement

les champs moyens de vitesse mesurés par 3D P.I.V. et de compléter l'étude comparative faite à ce sujet dans le Chapitre II.

3.1 Description qualitative des champs moyens générés par les mobiles TTP 125 et EE 150

L'écoulement moyen sera tout d'abord caractérisé sur base des champs moyens de vitesse mesurés par 3D P.I.V. Les Figures III-25 (a,b,c) et III-26 (a,b,c) présentent respectivement, pour le mobile TTP 125 et pour le mobile EE 150 :

- (a) Le champ moyen de vitesse obtenu à la vitesse de rotation N_{js} . La couleur du fond indique la valeur de la norme du vecteur de vitesse 3D en chaque point tandis que sa projection dans le plan du laser (*i.e.* ses composantes axiale $\overline{u_y}$ et radiale $\overline{u_x}$) est représentée par les flèches noires. Le plan vertical est celui qui forme un angle de 45° avec le plan passant à travers les contre-pales ;
- (b) La répartition spatiale de la composante tangentielle $\overline{u_z}$ du vecteur de vitesse dans ce même plan vertical ;
- (c) Le même champ moyen de vitesse que celui présenté au Point 3.1(a) normé par la vitesse en bout de pale $\pi N d$.

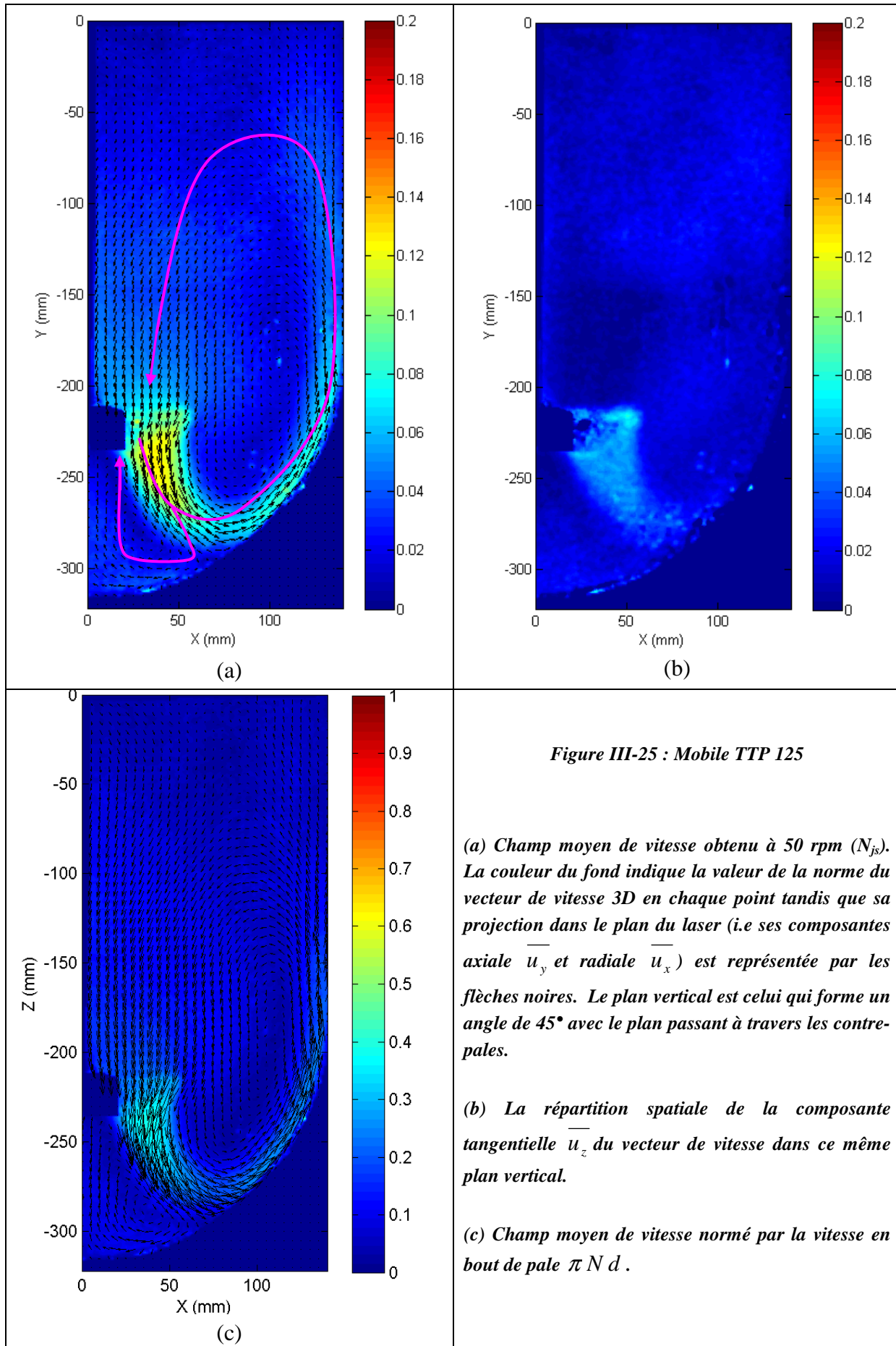
Tout comme au Chapitre II, les champs présentés sont relatifs à une demi-cuve. Leur bord droit correspond donc à la paroi de la cuve et leur bord gauche au centre de l'axe de rotation du mobile. Un masque est appliqué sur le moyeu du mobile.

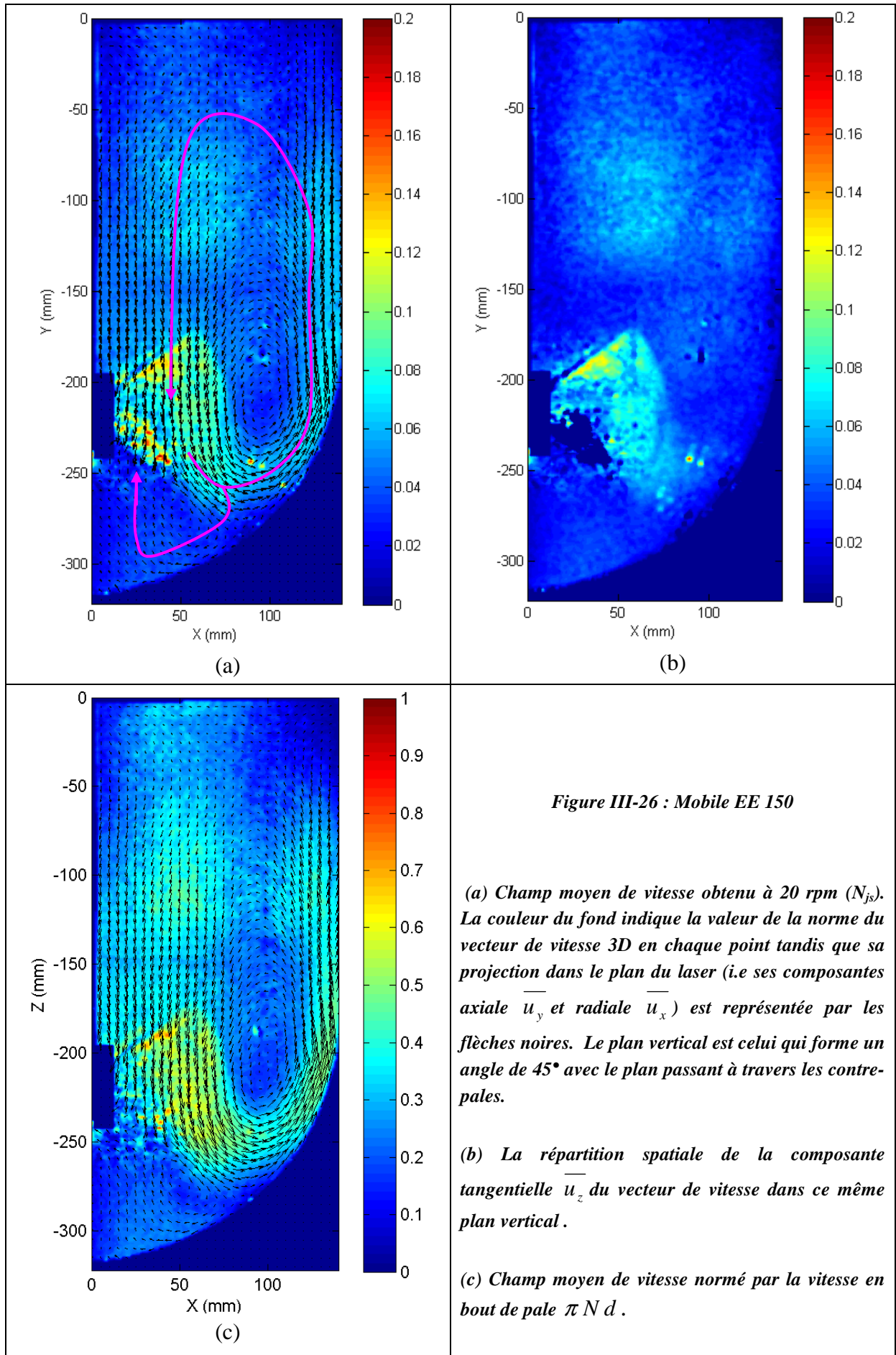
Les deux mobiles génèrent un écoulement moyen caractérisé par un jet à la sortie de leurs pales orienté principalement dans la direction axiale et qui se divise en deux boucles de recirculation. La première boucle couvre la zone située au-dessus du jet soit environ 5/6 de l'écoulement tandis que la seconde boucle couvre la zone restante située sous le jet.

La norme de la vitesse est maximale dans la zone balayée par le mobile ainsi que dans le jet à la sortie des pales (zone en jaune dans la Figure III-25 a et Figure III-26 c). Elle conserve une valeur intermédiaire dans la partie ascendante de la boucle de recirculation supérieure (zone turquoise dans la Figure III-25 a et Figure III-26 c) et présente des valeurs plus modérées dans le reste de l'écoulement (zone bleu roi dans la Figure III-25 a et Figure III-26 c).

Les Figures III-25b et III-26b montrent que la composante tangentielle de la vitesse moyenne conserve le même signe dans tout le plan ; *i.e.* que le fluide tourne d'un seul bloc dans la cuve. Son intensité est maximale dans la zone balayée par le mobile et dans son jet. Elle est nettement plus faible dans le reste de l'écoulement.

Les champs normés (Figures III-25 c et III-26 c) mettent en évidence la différence entre les champs moyens générés par les mobiles TTP 125 et EE 150 qui n'est pas observable sur les champs obtenus à la vitesse de rotation N_{js} (Figures III-25 a et III-26 a). Il s'agit de la capacité du mobile à transformer l'énergie fournie en circulation.





En effet, la Figure III-25c montre que dans le cas du mobile TTP 125, la vitesse maximale atteinte dans le champ moyen représente seulement 35% de la vitesse en bout de pale. Le reste de l'écoulement est caractérisé par des valeurs de vitesse inférieures ou égales à 10% de la vitesse en bout de pale. Le mobile EE 150 est, quant à lui, capable de générer dans le champ moyen une valeur de vitesse maximale correspondant à 60% de la vitesse en bout de pale. Plus de la moitié de l'écoulement moyen se caractérise par des valeurs de vitesse de l'ordre de 40% de la vitesse en bout de pale. Cette efficacité du mobile EE 150, probablement liée à son grand volume, explique d'ailleurs pourquoi il parvient à maintenir en suspension complète les microporteurs à une vitesse de rotation deux fois et demie plus petite que le mobile TTP 125.

3.2 Orientation de la composante principale de l'écoulement moyen

Comme il est complexe de représenter graphiquement les champs vecteurs moyens en trois dimensions, il est assez difficile de se faire une idée de l'importance de la composante tangentielle vis-à-vis des composantes axiale et radiale. Or, cette comparaison est assez intéressante pour savoir si l'écoulement généré par les mobiles est principalement axial ou mixte axio-tangential.

Pour répondre à cette question, deux angles sont calculés. Le premier est celui formé par la projection du vecteur 3D dans le plan du laser avec l'horizontale (Figure III-27, angle α). Il est estimé sur base du rapport entre la composante axiale et la composante radiale (Relation III-6). Plus cet angle est élevé et plus l'écoulement moyen est axial. Le second angle est celui formé par le vecteur 3D et le plan du laser (Figure III-27, angle β). Il est calculé sur base du rapport entre la norme du vecteur 3D et la norme de sa projection dans le plan du laser (Relation III-7). Plus cet angle est élevé et plus l'écoulement moyen présente une caractéristique tangentielle marquée.

$$\operatorname{tg} \alpha = \frac{\overline{u}_y}{\overline{u}_x} \quad (\text{III-6})$$

$$\operatorname{tg} \beta = \frac{\sqrt{\overline{u}_x^2 + \overline{u}_y^2 + \overline{u}_z^2}}{\sqrt{\overline{u}_x^2 + \overline{u}_y^2}} \quad (\text{III-7})$$

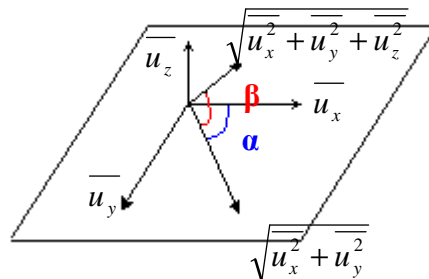


Figure III-27 : Outils de comparaison de l'intensité relative de la composante axiale vis-à-vis de la composante radiale (α) et de la composante tangentielle vis-à-vis de celles comprises dans le plan (β).

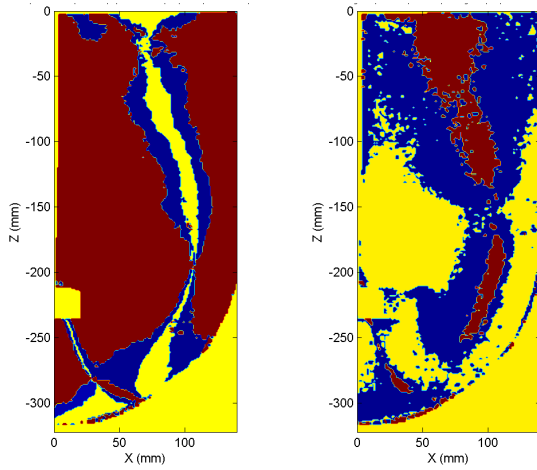


Figure III-28 : Mobile TTP 125, (gauche) comparaison de l'importance relative de la composante axiale par rapport à la composante radiale (α) (droite) et de la composante tangentielle par rapport à la projection dans le plan du laser (β) : bleu $<30^\circ$, jaune : $[30^\circ - 60^\circ]$ et rouge $>60^\circ$.

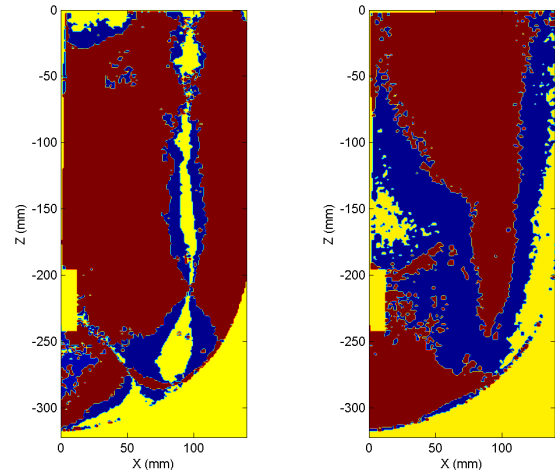


Figure III-29 : Mobile EE 150, (gauche) comparaison de l'importance relative de la composante axiale par rapport à la composante radiale (α) (droite) et de la composante tangentielle par rapport à la projection dans le plan du laser (β) : bleu $<30^\circ$, jaune : $[30^\circ - 60^\circ]$ et rouge $>60^\circ$.

Le mobile TTP 125 présente un écoulement moyen principalement axial alors que le mobile EE 150 présente un écoulement moyen mixte axio-tangential. En effet, la Figure III-28 montre, pour le mobile TTP 125, que dans la grande majorité du plan, la composante axiale prédomine sur la composante radiale ($\alpha > 60^\circ$, rouge) et la composante tangentielle n'est importante que dans les zones où les deux autres composantes sont faibles. Par contre, la Figure III-29 montre que les composantes tangentielle et axiale du mobile EE 150 sont importantes ($\alpha, \beta > 60^\circ$) dans l'ensemble du plan.

3.3 Distribution numérique des champs moyens

Pour quantifier les champs moyens de vitesse, les percentiles 25, 50, 75 et 90 des distributions numériques des composantes radiale, axiale, tangentielle et de la norme de la vitesse moyenne ont été calculés (Tableau III-1).

Comme le laisse présager la section précédente, les percentiles de la distribution numérique de la composante tangentielle de la vitesse moyenne générée par le mobile EE 150 sont nettement plus élevés (facteur 2) que ceux du mobile TTP 125 lorsque l'on compare les distributions obtenues à la vitesse de rotation N_{js} . Cela a un impact direct sur les percentiles de la norme de la vitesse, car ce même *ratio* est retrouvé entre les valeurs obtenues pour les deux mobiles.

Ces résultats auraient tendance à contredire l'observation faite au Chapitre II concernant la similitude d'écoulement moyen observé pour tous les mobiles à la vitesse de rotation N_{js} . Nous avons en effet conclu que c'était ce champ moyen de vitesse qui permettait de maintenir en suspension complète les microporteurs. Cette contradiction n'est qu'apparente, car un examen plus approfondi des résultats montre que les percentiles des distributions

numériques des composantes axiale et radiale générées par les deux mobiles sont similaires. Il en est logiquement de même pour la distribution numérique de la projection du vecteur de vitesse moyen dans le plan de mesure. Dès lors, nos conclusions du Chapitre II peuvent être maintenues car la composante de la vitesse qui participe activement à la mise en suspension des microporteurs est la composante axiale, les deux autres composantes participent uniquement à disperser les microporteurs dans l'ensemble de la cuve.

Tableau III-1 : Distribution numérique des composantes radiale, axiale, tangentielle, de la norme de la vitesse moyenne et de la norme de sa projection ($m s^{-1}$) dans le plan vertical de mesure à la vitesse N_{js} .

	$N=N_{js}$	P_{25}	P_{50}	P_{75}	P_{90}
$\overline{u_x}$	TTP 125	-0.0082	-0.0046	0.0005	0.0114
	EE 150	-0.0060	-0.0030	0.0005	0.0097
$\overline{u_y}$	TTP 125	-0.0250	-0.0072	0.0108	0.0281
	EE 150	-0.0252	-0.0057	0.0088	0.0336
$\overline{u_z}$	TTP 125	0.0098	0.0139	0.0184	0.0236
	EE 150	0.0261	0.0348	0.0442	0.0568
$\sqrt{\overline{u_x^2 + u_y^2 + u_z^2}}$	TTP 125	0.0182	0.0275	0.0384	0.0569
	EE 150	0.0346	0.0452	0.0567	0.0688
$\sqrt{\overline{u_x^2 + u_y^2}}$	TTP 125	0.0111	0.0210	0.0355	0.0534
	EE 150	0.0088	0.0199	0.0378	0.0481

3.4 Effet des deux contre-pales sur la structure de l'écoulement moyen

Dans la grande majorité des travaux publiés dans la littérature, les auteurs caractérisent l'écoulement dans une cuve agitée *via* des mesures P.I.V. réalisées dans un seul plan vertical passant par le centre de l'axe de rotation. Ils généralisent les résultats obtenus pour ce plan à l'ensemble du volume de la cuve en considérant que l'écoulement présente une symétrie de révolution autour de l'axe de rotation du mobile. Nous avons également adopté cette hypothèse au Chapitre II de ce travail. Cependant, cette hypothèse n'est pas strictement vérifiée à cause de la présence de contre-pales dans la cuve qui déforment localement l'écoulement et l'écartent ainsi d'une symétrie de révolution parfaite. Cette section a donc pour objectif d'évaluer l'effet des contre-pales sur la structure de l'écoulement moyen et ainsi d'évaluer la qualité de l'hypothèse de symétrie de révolution.

Les Figures III-31 et III-34 présentent les champs moyens de vitesse obtenus respectivement par le mobile EE 150 et TTP 125 dans les plans de mesure verticaux passant par l'axe de rotation du mobile et formant des angles de 9° , 27° , 45° , 63° et 81° avec le plan passant par les deux contre-pales (Figure III-8). Les résultats présentés sont relatifs à la vitesse de rotation N_{js} et la couleur du fond correspond à la norme des vecteurs de vitesse.

Les mêmes observations peuvent être faites pour les deux mobiles. Cependant l'effet est nettement plus visible sur les champs moyens de vitesse générés par le mobile EE 150 (Figure III-31). Ceci provient certainement de son volume plus important, qui induit forcément une proximité géométrique de ses pales vis-à-vis des contre-pales, et du caractère nettement plus tangentiel de son écoulement moyen.

L'écoulement moyen présente la même structure dans les plans formant un angle de 45° , 63° et 81° avec le plan des contre-pales. Cette structure a été décrite au Point 3.1 ci-dessus. Par contre, l'écoulement moyen présente des différences dans les deux plans les plus proches de la contre-pale (9° et 27°) par rapport aux résultats obtenus dans les autres plans. Ces différences sont d'autant plus marquées que le plan est proche de la contre-pale (plan 9°). La proximité de la contre-pale semble avoir pour effet de réduire l'étendue de la boucle de recirculation située au-dessus du jet. Ceci a pour conséquence d'induire un caractère nettement plus radial de l'écoulement dans la zone comprise entre $X = [50 \text{ à } 75 \text{ mm}]$ et $Y = [-50 \text{ à } -200 \text{ mm}]$ et de générer une zone à faible vitesse dans le coin supérieur du champ proche de la paroi. Dans le plan situé à 9° , cette zone couvre une surface équivalente à celle de la contre-pale pour le mobile EE 150 et à la moitié supérieure de cette surface pour le mobile TTP 125. La composante $\overline{u_z}$ de la vitesse moyenne change d'ailleurs de signe dans cette zone et est proportionnellement plus intense entre l'axe du mobile et cette zone à même coordonnée y . Ces observations indiquent l'existence d'une boucle de recirculation d'axe vertical à l'arrière des contre-pales (Figure III-30) dont l'étendue axiale est plus importante pour le mobile EE 150 que le mobile TTP 125.

L'écoulement moyen n'est par contre pas modifié par la présence des contre-pales dans le tiers inférieur de la cuve, ce qui est logique puisque cette zone n'est pas bafflée. Cette observation n'est cependant pas sans intérêt, car cette zone correspond au volume balayé par le mobile, sa zone d'éjection et la boucle inférieure de recirculation. Il s'agit d'une zone extrêmement importante comme nous le montrerons dans les sections suivantes.

Il apparaît donc que l'hypothèse de symétrie de révolution est parfaitement respectée dans le tiers inférieur de la cuve. Peut-on l'envisager dans les deux tiers supérieurs ? De manière stricte, la réponse serait négative si on se base sur les observations faites ci-dessus. Cependant, de manière plus nuancée, la réponse peut être positive. En effet, les Figures III-33 et III-36 montrent que le champ moyen de vitesse dans le plan formant un angle de 45° avec les contre-pales et le champ moyen obtenu en moyennant les champs mesurés dans les 5 plans présentent les mêmes profils axiaux, à la petite exception près du coin supérieur situé le long de la paroi. Nous adopterons dès lors dans les chapitres suivants l'hypothèse de symétrie de révolution de l'écoulement. Cette hypothèse s'avérera en particulier utile dans le Chapitre VI, où les caractérisations eulérienne et lagrangienne de l'écoulement seront combinées car il sera nécessaire de combiner les informations tirées des mesures réalisées en volume (coordonnées x, y, z successives de la particule au cours du temps) et des mesures réalisées dans cinq plans verticaux (valeur du cisaillement,).

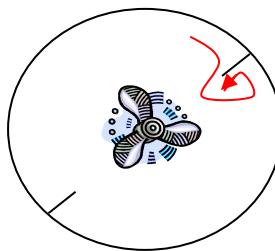


Figure III-30 : Illustration de la boucle de recirculation d'axe vertical qui se forme à l'arrière des contre-pales.

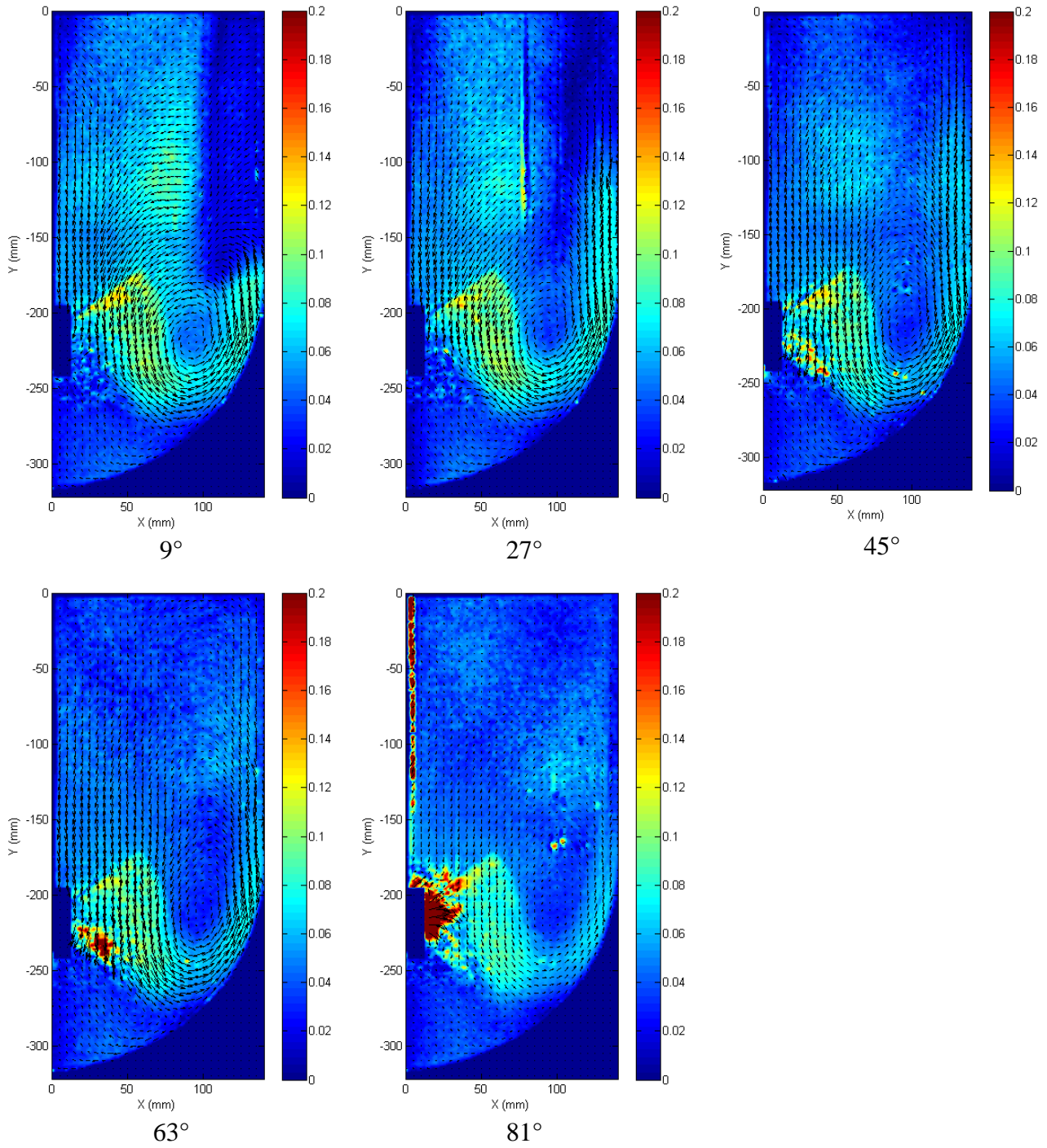
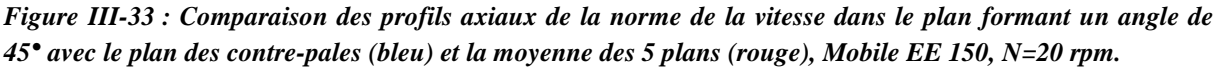
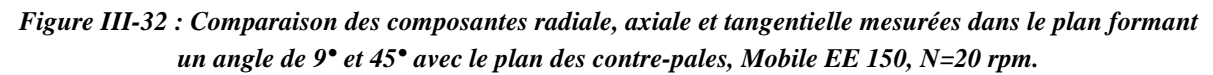


Figure III-31 : EE 150 : Champ moyen de vitesse obtenu à 20 rpm (N_{js}) dans les 5 plans de mesure verticaux. La couleur du fond indique la valeur de la norme des vecteurs de vitesse 3D en chaque point tandis que leurs projections dans le plan du laser sont représentées par les flèches noires.



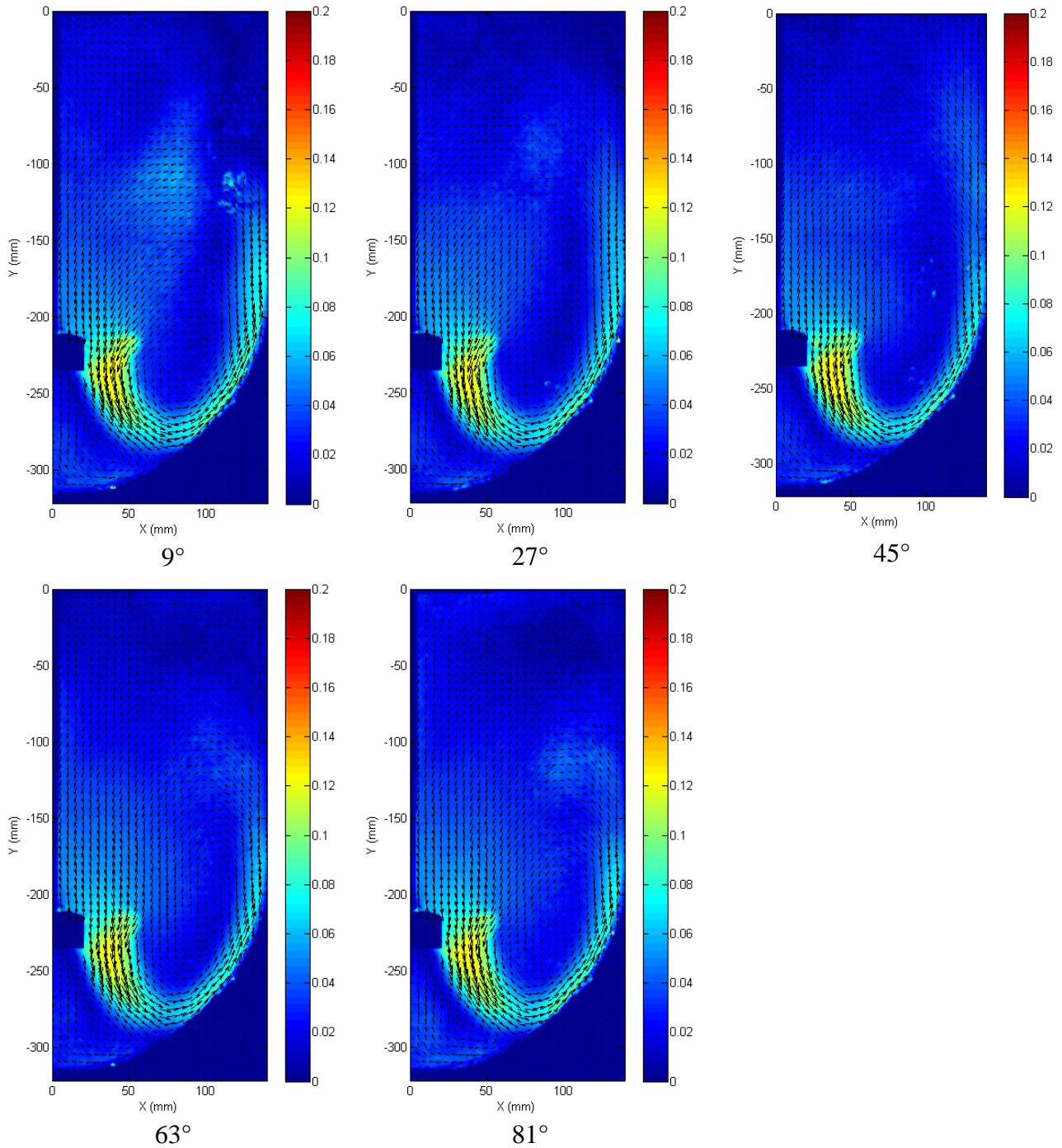


Figure III-34 : TTP 125 : Champ moyen de vitesse obtenu à 50 rpm (N_{js}) dans les 5 plans de mesure verticaux. La couleur du fond indique la valeur de la norme du vecteur de vitesse 3D en chaque point tandis que leurs projections dans le plan du laser sont représentées par les flèches noires.

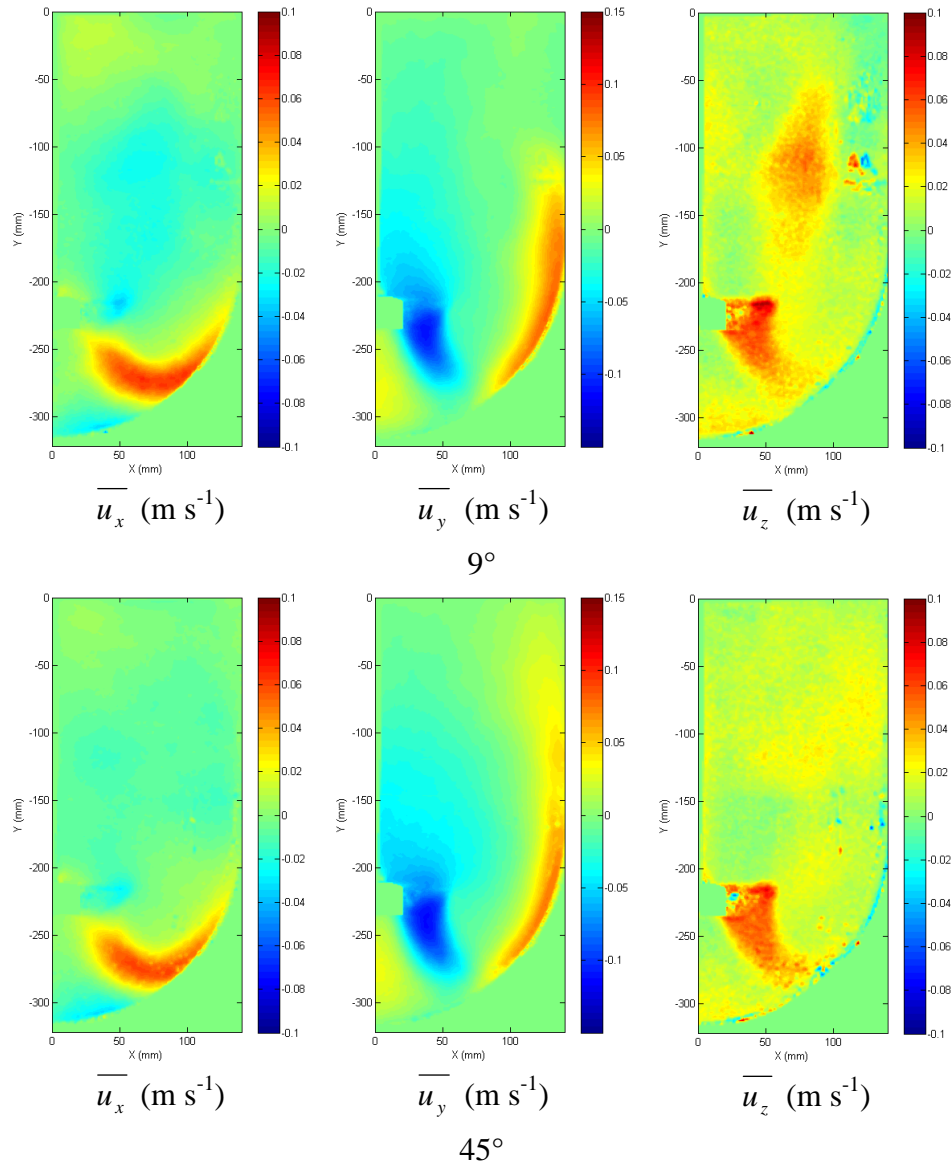


Figure III-35 : Comparaison des composantes radiale, axiale et tangentielle mesurées dans le plan formant un angle de 9° et 45° avec le plan des contre-pales, Mobile TTP 125, N=50 rpm.

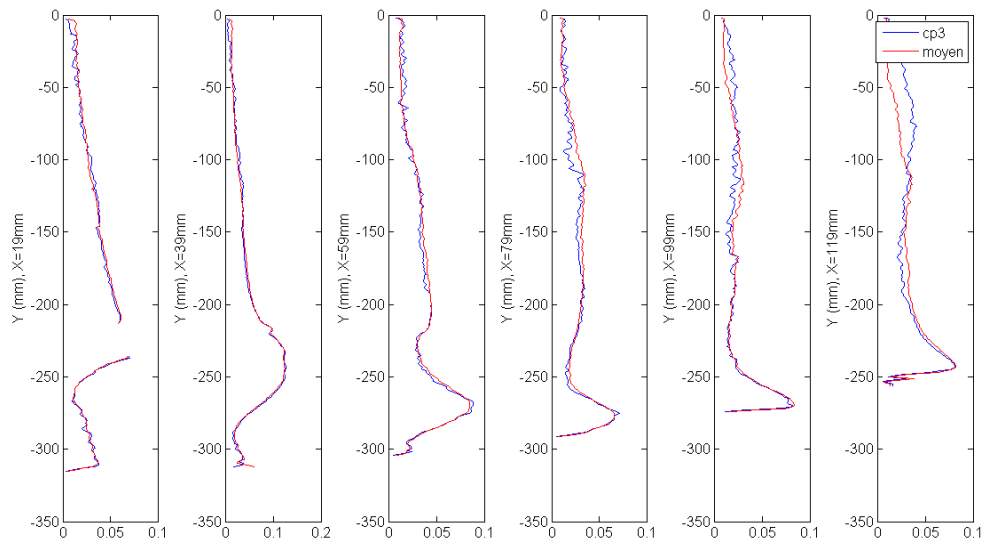


Figure III-36 : Comparaison des profils axiaux de la norme de la vitesse dans le plan formant un angle de 45° avec le plan des contre-pales (bleu) et la moyenne des 5 plans (rouge), Mobile TTP 125, N=50 rpm.

3.5 Synthèse

L'analyse des champs moyens générés par les mobiles TTP 125 et EE 150 à leur vitesse de rotation N_{js} fait apparaître des similitudes et des différences. Les mobiles génèrent tous les deux un écoulement axial composé d'un jet et de deux boucles de recirculation. A la vitesse de rotation N_{js} , leurs composantes comprises dans le plan vertical de mesure sont d'amplitudes similaires tandis que la composante tangentielle est deux fois plus importante pour le mobile EE 150. Dès lors, ce mobile présente un écoulement moyen mixte axio-tangential dont la symétrie de révolution est plus fortement déformée à la proximité des contre-pales que celle du mobile TTP 125.

4 Caractérisation de la composante turbulente de l'écoulement

Après caractérisation de la structure de la composante moyenne de l'écoulement, il semble judicieux, en accord avec l'approche de décomposition de Reynolds adoptée, de décrire la structure de la composante turbulente de l'écoulement. L'analyse porte sur deux grandeurs caractéristiques que sont l'énergie cinétique turbulente k et son taux de dissipation ε . Ces deux grandeurs sont toutes deux calculées, pour chaque condition de mesure, à partir de 300 champs instantanés de vitesse auxquels a été soustrait le champ moyen de vitesse correspondant afin d'obtenir les 300 champs de fluctuation de vitesse (Equation III-5). Le détail des calculs ainsi que les hypothèses s'y référant sont repris dans les sections suivantes.

4.1 Distribution de l'énergie cinétique turbulente

L'énergie cinétique turbulente est l'énergie cinétique associée à la composante fluctuante de la vitesse. Comme l'indique la Relation III-1, elle est définie comme égale à la moitié de la somme des carrés des moyennes quadratiques des composantes de fluctuation de la vitesse :

$$k = \frac{1}{2} \left(\overline{u_x'^2} + \overline{u_y'^2} + \overline{u_z'^2} \right) \quad (III-1)$$

Cependant, comme expliqué dans la Section 2.2 (validation des mesures 3D P.I.V.), la moyenne quadratique de la composante tangentielle doit être estimée à partir des moyennes quadratiques des deux composantes de fluctuation de la vitesse comprises dans le plan de mesure en faisant l'hypothèse d'« isotropie ». L'énergie cinétique turbulente est donc calculée par la Relation III-4 :

$$k = \frac{3}{4} \left(\overline{u_x'^2} + \overline{u_y'^2} \right) \quad (III-4)$$

Avant d'étudier les distributions spatiales et numériques de l'énergie cinétique turbulente au sein du bioréacteur, il est important de déterminer si le nombre et la résolution spatiale des mesures réalisées permettent d'accéder à des valeurs fiables de l'énergie cinétique turbulente. Il faut tout d'abord vérifier que le nombre de champs fluctuants est suffisant pour obtenir un résultat convergé. La Figure III-37 montre que la convergence du champ d'énergie cinétique turbulent est atteinte à partir de 200 champs fluctuants, ce qui est largement inférieur au nombre total de champs mesurés, égal à 300. Ensuite, il faut s'assurer que la résolution spatiale des mesures P.I.V. est suffisante pour couvrir toute la gamme d'échelles spatiales

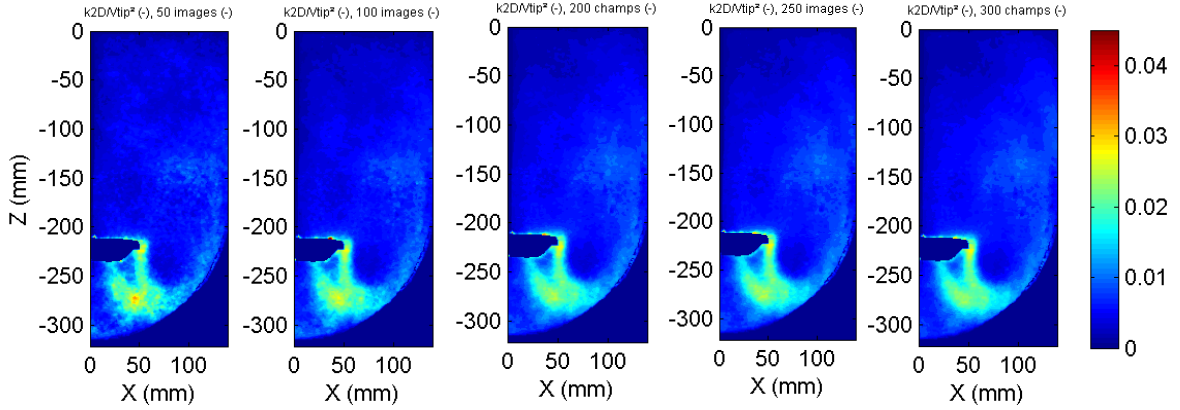


Figure III-37 : Etude de la convergence de l'énergie cinétique turbulente en fonction du nombre de champs fluctuants utilisé pour la calculer.

correspondant au spectre de l'énergie cinétique turbulente ; ce spectre s'étendant de l'échelle intégrale, dont l'ordre de grandeur est similaire au dixième du diamètre du mobile, à l'échelle de Taylor (Figure III-38). Dans le cas où la résolution spatiale des mesures P.I.V. est plus grande que cette échelle de Taylor, les structures dont la taille est comprise entre l'échelle de Taylor et la résolution spatiale ne sont pas mesurées, tout comme l'énergie cinétique turbulente qui y est associée. Dans ce cas, l'énergie cinétique turbulente calculée à partir des mesures P.I.V. est donc sous-estimée. Dans la présente étude, l'échelle de Taylor a été estimée à partir des champs fluctuants en utilisant la Relation III-8 tirée de la publication de Hall *et al.* (2005) :

$$\lambda_{Taylor} = \sqrt{\frac{10\nu\Lambda}{1.1\sqrt{u'^2}}} \quad (III-8)$$

où Λ est l'échelle intégrale supposée égale au dixième du diamètre du mobile. Cette relation provient d'une analyse dimensionnelle liant les différentes grandeurs.

D'autres corrélations existent (Saarenrinne *et al.*, 2001 ; Piirto *et al.*, 2000), par exemple :

$$\lambda_{Taylor} = \sqrt{\frac{15\nu\overline{u'^2}}{\varepsilon}} \quad \text{ou} \quad \lambda_{Taylor} = \sqrt{\frac{2\overline{u'^2}}{\left(\frac{\partial u'}{\partial x}\right)^2}} \quad (III-9)$$

mais ces deux relations présentent l'inconvénient de faire intervenir des grandeurs (ε et $\partial u'/\partial x$) dont l'estimation dépend encore plus fortement de la résolution spatiale des mesures comme le montrent les travaux de Saarenrinne *et al.* (2001).

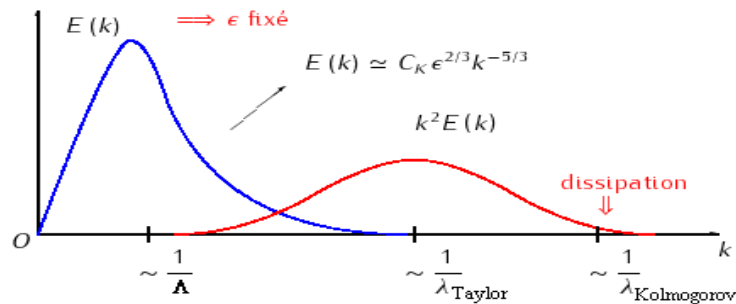


Figure III-38 : Spectre de l'énergie cinétique turbulente et de son taux de dissipation (Bailly et Marsden, 2011) L'abscisse est exprimée en nombre d'onde K .

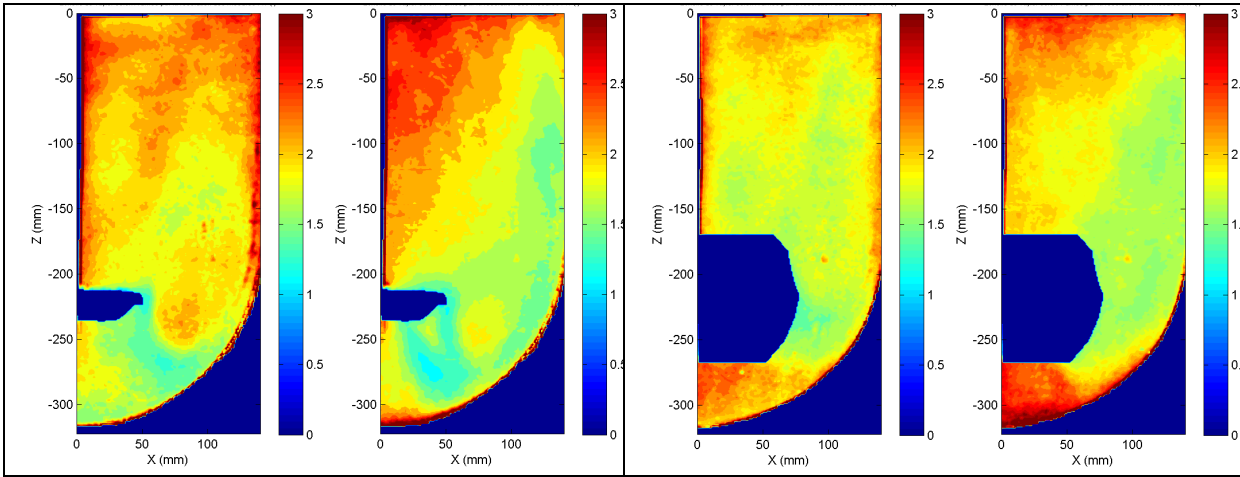


Figure III-39 : Distribution du ratio entre la résolution des mesures 3D P.I.V. et l'échelle de Taylor estimée à partir de la moyenne quadratique de la composante radiale (gauche) ou axiale (droite) de la fluctuation de la vitesse à la vitesse de rotation N_{js} . Cadre de gauche : mobile TTP 125, cadre de droite mobile EE 150.

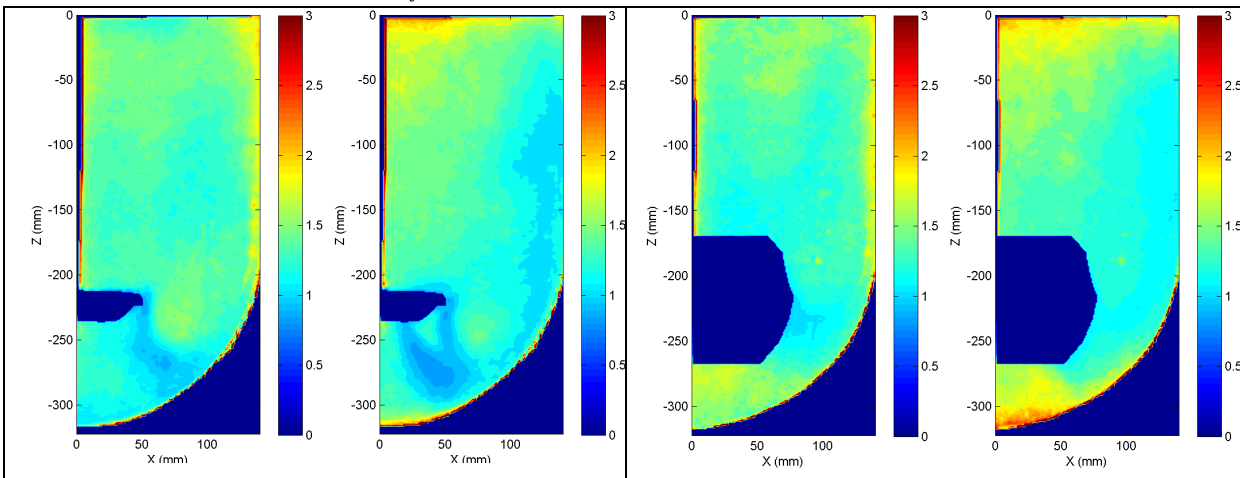


Figure III-40 : Distribution du ratio entre la résolution des mesures 3D P.I.V. et l'échelle de Taylor estimée à partir de la moyenne quadratique de la composante radiale (gauche) ou axiale (droite) de la fluctuation de la vitesse à la vitesse de rotation $2 N_{js}$. Cadre de gauche : mobile TTP 125, cadre de droite mobile EE 150.

Les Figures III-39 et III-40 montrent le *ratio* entre l'échelle de Taylor (Relation III-8) et la résolution spatiale des mesures (1.25 mm) pour des vitesses de rotation égales à N_{js} et à $2 N_{js}$. Pour la première vitesse, on observe que le *ratio* est supérieur à un pour les deux mobiles dans l'ensemble du plan. C'est également le cas pour la seconde vitesse pour le mobile EE 150. Pour le mobile TTP 125 par contre, on observe une petite zone dans le jet de la pale où le *ratio* est inférieur à 1. Cependant, les valeurs du *ratio* dans cette zone restent très proches de 1 car la valeur minimale observée est de l'ordre de 0.9. De plus, l'étendue de la zone concernée reste très limitée par rapport à l'ensemble du volume de la cuve (< 5%). Cette analyse montre donc que les mesures P.I.V. peuvent être utilisées pour analyser, de manière fiable, la distribution de l'énergie cinétique turbulente non seulement à la vitesse de rotation N_{js} mais également à des vitesses de rotation plus élevées, comprises entre N_{js} et $2 N_{js}$.

La distribution spatiale de l'énergie cinétique turbulente k est présentée dans les Figures III-42 (TTP 125) et III-43 (EE 150), d'une part de manière dimensionnelle à la vitesse de rotation N_{js} (gauche) et d'autre part de manière adimensionnelle en la divisant par le carré de la vitesse en

bout de pale (droite). La première présentation permet de comparer les distributions générées par les deux mobiles à N_{js} tandis que la seconde présentation permet de faire ressortir les caractéristiques propres de chaque mobile.

À la vitesse de rotation N_{js} , les deux mobiles présentent une énergie cinétique turbulente maximale dans le jet à la sortie des pales, un niveau intermédiaire d'énergie cinétique turbulente dans la partie ascendante de la boucle de recirculation supérieure ainsi que dans la zone d'aspiration au-dessus des pales et un niveau nettement plus faible dans le reste de l'écoulement. La zone où l'énergie cinétique turbulente est maximale pour le mobile TTP

125 présente une forme particulière composée de deux lobes qui sont séparés par une zone accolée à une portion de la pale où les valeurs sont intermédiaires. Cette forme particulière a été également observée dans la publication d'Aubin *et al.* (2001). Le lecteur peut remarquer que les deux lobes semblent prendre naissance d'une part à l'extrémité de la pale et d'autre part au niveau de sa cassure inférieure (zone rouge sur Figure III-41). La zone à valeur modérée semble accolée à la partie incurvée de la



Figure III-41 :
Mobile TTP 125
(rouge) : zone où k est maximale,
(bleu) : zone où k est intermédiaire.

pale (zone bleu sur la Figure III-41). Bugay (1998) observe ce même type de profil autour des pales du mobile A310 (Lightnin). Il propose comme explication que les zones à fortes valeurs d'énergie cinétique turbulente correspondent à des zones où sont générés des tourbillons qui se détachent de la pale. Les Figures III-42 et III-43 montrent encore qu'à la vitesse de rotation N_{js} les deux mobiles génèrent une valeur d'énergie cinétique turbulente similaire. La zone à valeur faible est par contre plus étendue pour le mobile TTP 125. Ces deux dernières observations sont d'ailleurs clairement mises en évidence dans les distributions numériques de l'énergie cinétique turbulente (Tableau III-2); on observe en effet que les percentiles 90, 95 et 99 sont quasi identiques tandis que les percentiles 25, 50 et 75 sont deux fois moindres pour les résultats du mobile TTP 125 par rapport aux résultats du mobile EE 150.

Tableau III-2 : Distribution numérique de l'énergie cinétique turbulente.

		P_{25}	P_{50}	P_{75}	P_{90}	P_{95}	P_{99}
$k \text{ (m}^2 \text{ s}^{-2}\text{)}$ $N=N_{js}$	TTP 125	3.7×10^{-4}	5.7×10^{-4}	7.9×10^{-4}	0.0011	0.0016	0.0021
	EE 150	6.5×10^{-4}	9.8×10^{-4}	0.0013	0.0015	0.0016	0.0020
$k/(\pi N d)^2 \text{ (-)}$	TTP 125	0.0034	0.0054	0.0074	0.0105	0.0150	0.0194
	EE 150	0.0217	0.0328	0.0431	0.0493	0.0529	0.0674

Lorsque les distributions de l'énergie cinétique turbulente sont présentées de manière normée, une différence nette entre les deux mobiles est observée. Le mobile EE 150 génère une énergie cinétique turbulente adimensionnelle trois fois plus intense que celle produite par le mobile TTP 125. Une observation du même type avait déjà été faite lors de l'analyse des champs moyens. La représentation adimensionnelle du champ de l'énergie cinétique turbulente permet également de confronter nos résultats à ceux de la littérature. Un excellent accord est obtenu entre nos mesures et les travaux d'Aubin *et al.* (2001) qui observent, à partir de mesures LDV, la génération par un mobile TTP ($d/T=0.5$) d'une valeur maximale de l'énergie cinétique turbulente de l'ordre de $0.03 \pi^2 N^2 d^2$ et une répartition similaire à celle présentée ici. L'absence, dans la littérature, de données fiables relatives au mobile EE 150 nous empêche de comparer les résultats obtenus. En effet, les deux seules publications

(Simmons *et al.*, 2007 ; Zhu *et al.*, 2008) qui étudient la structure de l'écoulement turbulent généré par ce mobile se basent sur des mesures P.I.V. dont la résolution spatiale est nettement moins bonne (respectivement 3.1 mm et 4.8 mm). Les valeurs maximales d'énergie cinétique turbulente mesurées sont donc nettement plus faibles ($\approx 0.025 \pi^2 N^2 d^2$) que celles obtenues dans le présent travail. Les auteurs de ces deux publications admettent d'ailleurs qu'ils ne mesurent qu'une fraction de l'énergie cinétique turbulente totale. Cependant, une valeur maximale de l'énergie cinétique turbulente de l'ordre de $0.075 \pi^2 N^2 d^2$, comme cela est observé à la Figure III-42, semble envisageable si on compare cette valeur à celle obtenue pour des turbines à pales inclinées dont le design n'est finalement pas si éloigné. Les travaux de Khan *et al.* (2006) annoncent une valeur maximale de $0.06 \pi^2 N^2 d^2$ pour une turbine à 4 pales inclinées à 45° ($d/T = 0.33$) tandis que ceux de Unadkat *et al.* (2009) donnent des valeurs de $0.12 \pi^2 N^2 d^2$. Les simulations numériques de Kumaresan et Joshi (2006) conduisent à des valeurs comprises entre $0.04 \pi^2 N^2 d^2$ et $0.05 \pi^2 N^2 d^2$.

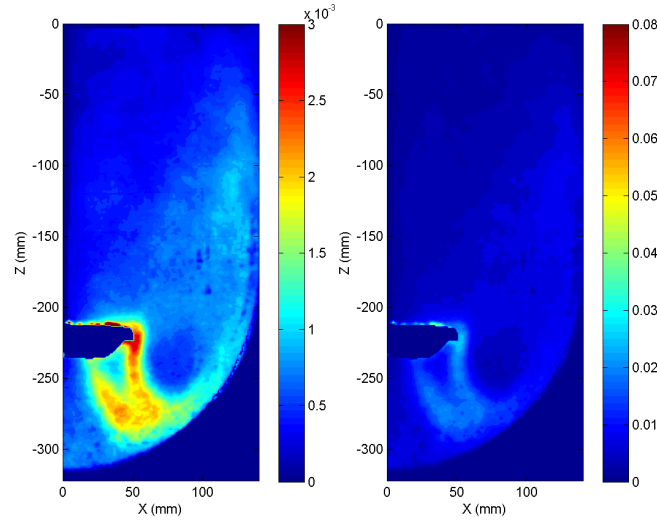


Figure III-42 : Mobile TTP 125 : (gauche) : distribution de l'énergie cinétique turbulente ($m^2 s^{-2}$) à la vitesse de rotation N_{js} . (droite) : distribution adimensionnelle de l'énergie cinétique turbulente normée par le carré de la vitesse au bout de pale $\pi^2 N^2 d^2$.

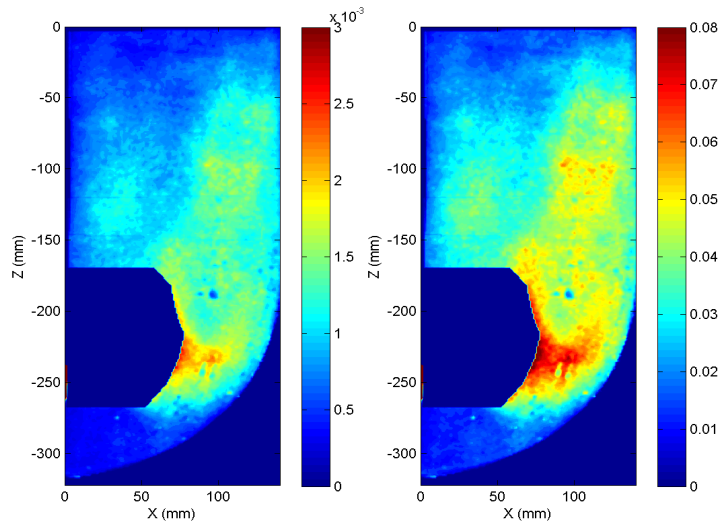


Figure III-43 : Mobile EE 150 : (gauche) : distribution de l'énergie cinétique turbulente ($m^2 s^{-2}$) à la vitesse de rotation N_{js} . (droite) : distribution adimensionnelle de l'énergie cinétique turbulente normée par le carré de la vitesse au bout de pale $\pi^2 N^2 d^2$.

Nous terminerons cette section consacrée à l'étude de la distribution de l'énergie cinétique turbulente au sein de la cuve en vérifiant que l'hypothèse de symétrie de révolution peut de nouveau être appliquée. Les Figures III-44 et III-45 ci-dessous montrent effectivement que les profils axiaux de $k/\pi^2 N^2 d^2$ mesuré dans les 5 plans verticaux se superposent et coïncident logiquement avec le profil obtenu en calculant leur moyenne.

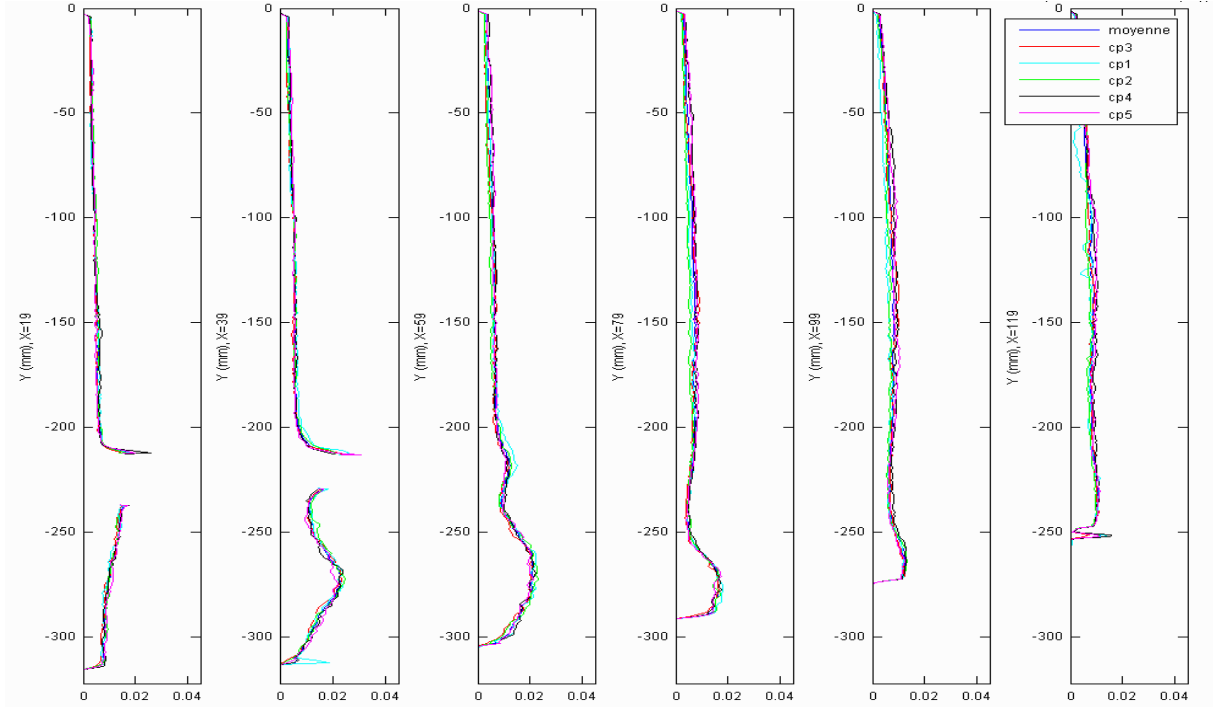


Figure III-44 : Mobile TTP 125 : Comparaison des profils axiaux de $k/\pi^2 N^2 d^2$ obtenus dans les différents plans verticaux avec les profils moyens (bleu foncé) obtenus en moyennant les résultats acquis dans les cinq plans.

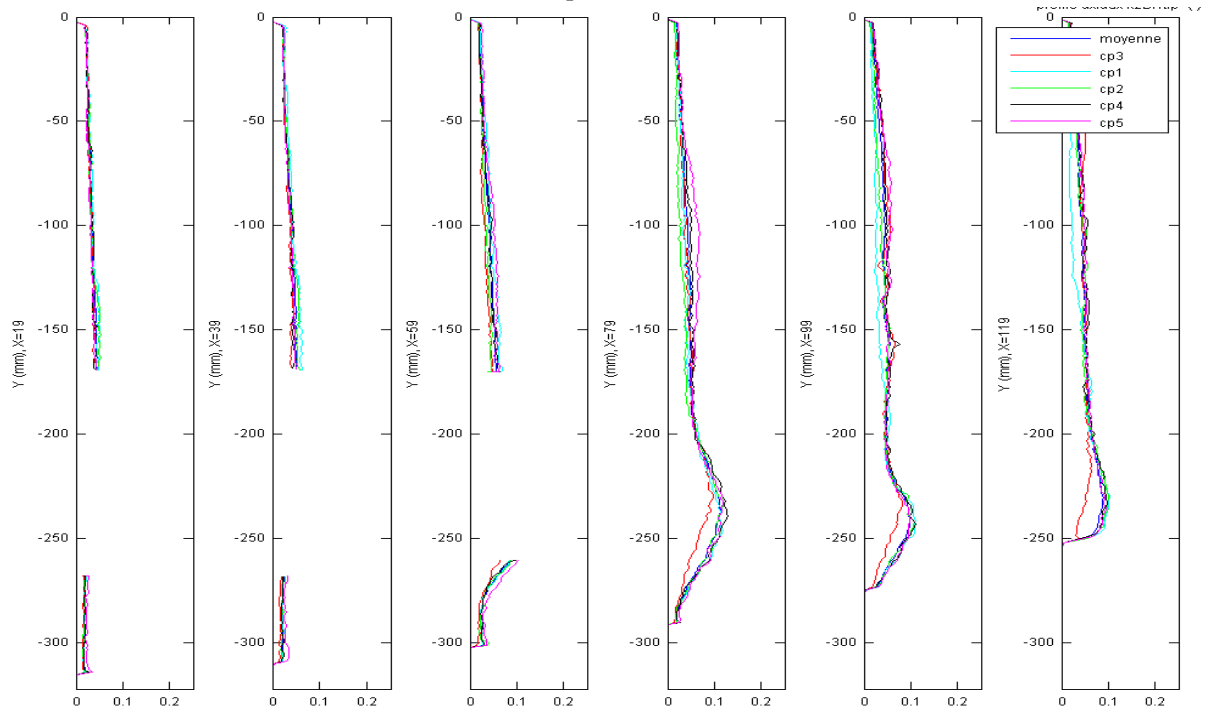


Figure III-45 : Mobile EE 150 : Comparaison des profils axiaux de $k/\pi^2 N^2 d^2$ obtenus dans les différents plans verticaux avec les profils moyens (bleu foncé) obtenus en moyennant les résultats acquis dans les cinq plans.

4.2 Distribution du taux de dissipation de l'énergie cinétique turbulente

Lorsque la décomposition de Reynolds est appliquée au bilan d'énergie cinétique turbulente, l'Equation III-10 ci-dessous fait apparaître le terme du taux de dissipation visqueuse de l'énergie cinétique turbulente, ε , et en donne la définition. Le taux de dissipation de l'énergie cinétique turbulente est lié à la dissipation, par les forces de frottements visqueuses, de l'énergie cinétique associée au mouvement fluctuant. Cette dissipation ne peut se produire que si les forces visqueuses l'emportent sur les forces inertielles, *i.e.* si le nombre de Reynolds associé au tourbillon est inférieur ou égal à 1, ce qui n'est le cas que pour les tourbillons les plus petits, dont la taille est proche de l'échelle de Kolmogorov.

$$\begin{aligned}
 & \boxed{\frac{1}{2} \frac{\partial k}{\partial t}} + \boxed{\frac{1}{2} u_i \frac{\partial k}{\partial x_i}} = \boxed{-u_i' u_j' \frac{\partial u_i'}{\partial x_j}} - \boxed{\frac{1}{2} \frac{\partial}{\partial x_i} (\overline{u_i' k})} - \boxed{\frac{\partial}{\partial x_i} (\overline{u_i' \frac{p}{\rho_l}})} \\
 & \downarrow \quad \quad \quad \downarrow \quad \quad \quad \downarrow \quad \quad \quad \downarrow \quad \quad \quad \downarrow \\
 & \text{Instationnaire} \quad \quad \quad \text{Convection} \quad \quad \quad \text{Production} \quad \quad \quad \text{Diffusion turbulente} \quad \quad \quad \text{Diffusion par pression} \quad (III-10)
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 & + \nu \frac{\partial}{\partial x_i} u_j' \left(\frac{\partial u_i'}{\partial x_j} + \frac{\partial u_j'}{\partial x_i} \right) - \nu \frac{\partial}{\partial x_i} \frac{\partial u_j'}{\partial x_i} \left(\frac{\partial u_i'}{\partial x_j} + \frac{\partial u_j'}{\partial x_i} \right) \\
 & \downarrow \quad \quad \quad \downarrow \\
 & \text{Diffusion visqueuse} \quad \quad \quad \text{Dissipation visqueuse} = \varepsilon
 \end{aligned}$$

Dès lors, si on abandonne la notation d'Einstein employée dans l'Equation III-10 et que l'on explicite l'expression du taux de dissipation de l'énergie cinétique turbulente (Equation III-11), on constate que, pour mesurer directement le taux de dissipation de l'énergie cinétique turbulente, il faut mesurer simultanément, dans l'ensemble d'un volume tridimensionnel, les trois composantes de fluctuation de vitesse avec une résolution spatiale proche de l'échelle de Kolmogorov (soit quelques dizaines de μm).

$$\varepsilon = \nu \left\{ \begin{aligned} & 2 \left(\overline{\left(\frac{\partial u'_x}{\partial x} \right)^2} + \overline{\left(\frac{\partial u'_y}{\partial x} \right)^2} + \overline{\left(\frac{\partial u'_z}{\partial x} \right)^2} + \overline{\left(\frac{\partial u'_x}{\partial y} \right)^2} + 2 \overline{\left(\frac{\partial u'_y}{\partial y} \right)^2} + \overline{\left(\frac{\partial u'_z}{\partial y} \right)^2} + \overline{\left(\frac{\partial u'_x}{\partial z} \right)^2} \right. \\ & \left. + \overline{\left(\frac{\partial u'_y}{\partial z} \right)^2} + 2 \overline{\left(\frac{\partial u'_z}{\partial z} \right)^2} + 2 \left(\overline{\left(\frac{\partial u'_x}{\partial y} \right) \left(\frac{\partial u'_y}{\partial x} \right)} + \overline{\left(\frac{\partial u'_x}{\partial z} \right) \left(\frac{\partial u'_z}{\partial x} \right)} + \overline{\left(\frac{\partial u'_y}{\partial z} \right) \left(\frac{\partial u'_z}{\partial y} \right)} \right) \right\} \quad (III-11)
 \end{aligned}$$

Ces conditions relatives à la résolution spatiale des mesures et au volume étudié ne sont jamais remplies de manière simultanée, même avec les outils de mesure les plus performants comme la P.I.V. ou la L.D.A. (Laser Doppler Anemometry). En dépit de ce constat et parce que la répartition de cette grandeur est un élément clé pour de nombreux procédés (bio)-chimiques, diverses méthodes de calculs ont été proposées pour estimer ε sur base des mesures expérimentales. Il n'existe cependant, à ce jour, aucune méthode qui soit parfaitement exacte. L'écart par rapport à la réalité et la fiabilité de chaque méthode est fonction des hypothèses qui ont été nécessaires pour établir la relation mathématique utilisée.

Dans les prochains paragraphes, les différentes méthodes les plus fréquemment employées dans la littérature pour estimer ε seront présentées. L'accent sera porté sur leurs hypothèses sous-jacentes afin de justifier le choix de la méthode dimensionnelle, retenue dans ce travail. .

Le détail des calculs relatifs à cette méthode seront ensuite explicités avant de décrire et de commenter les résultats relatifs à la répartition du taux de dissipation de l'énergie cinétique turbulente dans les plans de mesures.

4.2.1 Méthodes de calcul de ε

La première méthode, généralement appelée « méthode directe », consiste à employer directement la définition du taux de dissipation de l'énergie cinétique turbulente, soit la Relation III-11. Les dérivées non mesurables telles que celles dans la direction perpendiculaire au plan de mesure P.I.V. sont estimées à partir des dérivées comprises dans le plan de mesures, en faisant l'hypothèse d'une turbulence statistiquement isotrope :

$$\begin{aligned} \overline{\left(\frac{\partial u'_z}{\partial z}\right)^2} &= \frac{1}{2} \left[\overline{\left(\frac{\partial u'_x}{\partial x}\right)^2} + \overline{\left(\frac{\partial u'_y}{\partial y}\right)^2} \right] \\ \overline{\left(\frac{\partial u'_x}{\partial z}\right)^2} &= \overline{\left(\frac{\partial u'_y}{\partial z}\right)^2} = \overline{\left(\frac{\partial u'_z}{\partial x}\right)^2} = \overline{\left(\frac{\partial u'_z}{\partial y}\right)^2} = \frac{1}{2} \left[\overline{\left(\frac{\partial u'_x}{\partial y}\right)^2} + \overline{\left(\frac{\partial u'_x}{\partial x}\right)^2} \right] \\ \overline{\left(\frac{\partial u'_x}{\partial z} \frac{\partial u'_z}{\partial x}\right)} &= \overline{\left(\frac{\partial u'_y}{\partial z} \frac{\partial u'_z}{\partial y}\right)} = -\frac{1}{4} \left[\overline{\left(\frac{\partial u'_x}{\partial x}\right)^2} + \overline{\left(\frac{\partial u'_y}{\partial y}\right)^2} \right] \end{aligned} \quad (III-12)$$

L'Expression III-11 de ε se réduit donc à :

$$\varepsilon = \nu \left\{ 2 \overline{\left(\frac{\partial u'_x}{\partial x}\right)^2} + 3 \overline{\left(\frac{\partial u'_y}{\partial x}\right)^2} + 3 \overline{\left(\frac{\partial u'_x}{\partial y}\right)^2} + 2 \overline{\left(\frac{\partial u'_y}{\partial y}\right)^2} + 2 \overline{\left(\frac{\partial u'_x}{\partial y} \frac{\partial u'_y}{\partial x}\right)} \right\} \quad (III-13)$$

La fiabilité de cette expression est donc liée à celle des Expressions III-12. Cependant, cette relation est peu utilisable en pratique car elle nécessite une résolution spatiale des mesures P.I.V. aussi fine que l'échelle de Kolmogorov pour obtenir une estimation fiable de ε . En effet, d'après les travaux de Saarenrinne *et al.* (2001), si le *ratio* entre la résolution spatiale des mesures P.I.V. et l'échelle de Kolmogorov vaut 2, la Relation III-13 prédit une valeur de ε correspondant approximativement à 90% du taux de dissipation réelle. Lorsque le *ratio* vaut 9, seulement 65% du taux de dissipation réelle est mesuré. Avec le dispositif P.I.V. utilisé dans le présent travail, l'obtention d'une résolution spatiale des mesures de l'ordre de l'échelle de Kolmogorov impliquerait de limiter très fortement la taille de la zone étudiée de l'écoulement à celle d'un timbre poste. En effet, si on souhaite une résolution P.I.V. de 100 μm en appliquant un traitement de corrélation croisée sur des fenêtres d'interrogation de 8×8 pixels², la zone observée par une caméra avec un capteur de 1024×1280 pixels² a une taille réelle de 12.5×16 mm². Dès lors, étudier l'ensemble de l'écoulement (*i.e.* 150×300 mm²) par zones successives serait un travail extrêmement long et fastidieux. C'est pour cette raison que nous n'avons pas choisi cette méthode dans le présent travail.

La deuxième méthode, appelée la « LE-P.I.V. » a été proposée pour pallier au problème de résolution spatiale rencontré dans la méthode précédente. Elle est basée sur les mêmes théories que la méthode de simulation numérique LES (Large Eddy Simulation). En effet,

dans les simulations LES, tout comme dans les mesures P.I.V., le champ fluctuant de vitesse est résolu jusqu'à une certaine échelle (la taille de la maille CFD ou la résolution des mesures P.I.V.). Il semble donc logique, vu la similitude, d'employer les modèles de turbulence développés dans le cadre des simulations LES (modèles de sous-maille), pour calculer la contribution au taux de dissipation de l'énergie cinétique turbulente des échelles non mesurées dans les mesures P.I.V.. Un exemple de modèle de sous-maille est celui développé par Smagorinsky (1963) qui estime le taux de dissipation de l'énergie cinétique turbulente par :

$$\begin{aligned}\varepsilon_{SGS} &= \frac{1}{2} \nu_t \overline{\left(\frac{\partial u'_i}{\partial x_j} + \frac{\partial u'_j}{\partial x_i} \right)^2} = (C_s \Delta)^2 \left[\frac{1}{2} \overline{\left(\frac{\partial u'_i}{\partial x_j} + \frac{\partial u'_j}{\partial x_i} \right)^2} \right]^{3/2} \\ \nu_t &= (C_s \Delta)^2 \left[\frac{1}{2} \overline{\left(\frac{\partial u'_i}{\partial x_j} + \frac{\partial u'_j}{\partial x_i} \right)^2} \right]^{1/2}\end{aligned}\tag{III-14}$$

La viscosité turbulente ν_t est calculée à partir des gradients de fluctuation de vitesse mesurée par P.I.V. et de deux paramètres : la résolution spatiale, Δ , et la constante de Smagorinsky C_s , dont la valeur est habituellement choisie entre 0.17 et 0.21 (Sheng *et al.*, 2000 ; Sharp et Adrian, 2001). Comme le montrent les travaux de Gabriele *et al.* (2009), l'inconvénient principal de cette méthode est la forte dépendance du taux de dissipation estimé vis-à-vis de la constante C_s . En effet, si C_s est multiplié par 2, ε_{SGS} est multiplié par 4. Le choix de la valeur de C_s est donc critique et fait encore l'objet de nombreux débats. C'est pour cette raison que nous n'avons pas non plus choisi cette méthode dans le présent travail.

La troisième méthode exploite le bilan d'énergie cinétique turbulente présenté ci-avant (Equation III-10) pour estimer le terme de dissipation de l'énergie cinétique turbulente à partir de l'estimation des autres termes. Cette méthodologie a été utilisée, entre autres, dans les travaux de Micheletti *et al.* (2004) et dans ceux d'Escudié et Liné (2003). Cependant, un terme de diffusion par pression apparaît dans la Relation III-10. Pour estimer ce terme, Escudié et Liné (2003) ont montré qu'il était nécessaire de réaliser des mesures P.I.V. synchronisées avec la position des pales du mobile, afin de pouvoir décomposer la vitesse instantanée en une composante moyenne, une composante périodique liée au passage des pales et une composante purement fluctuante. Le bilan d'énergie cinétique turbulente est alors reformulé pour chaque type de composante, ce qui permet d'estimer le terme de diffusion par pression à partir du bilan sur la composante périodique et donc d'estimer le terme de dissipation de l'énergie cinétique turbulente. Le dispositif P.I.V. utilisé dans notre étude n'est pas synchronisé avec le mouvement des pales. Il n'est donc pas possible d'extraire, de la décomposition de Reynolds, le terme correspondant au mouvement périodique des pales. Cette méthode n'est donc pas utilisable avec nos mesures.

Enfin, la dernière méthode présentée dans cette introduction et que nous utiliserons dans la suite ce travail est basée sur la théorie de la cascade d'énergie de Richardson et Kolmogorov (Pope, 2000). Cette méthode, appelée la « méthode dimensionnelle », repose sur l'hypothèse

que l'énergie cinétique turbulente générée au sein des grands tourbillons n'est dissipée qu'au sein des plus petits tourbillons. Dans cette gamme d'échelle (gamme inertielle présentée à la Section 2.1 du Chapitre I), l'énergie est transférée sans dissipation avec un taux constant, ε . Sur base de cette hypothèse, l'énergie cinétique turbulente et son taux de dissipation sont liés par la relation :

$$\varepsilon = \frac{k^{3/2}}{\Lambda} \quad (\text{III-15})$$

où Λ est l'échelle intégrale (Relation III-8) qui correspond à la taille des tourbillons les plus énergétiques (Figure III-38).

4.2.2 Estimation de ε par la méthode dimensionnelle

Le taux de dissipation de l'énergie cinétique turbulente estimé par la méthode dimensionnelle (Relation III-15) ne dépend que de deux grandeurs : l'énergie cinétique turbulente et l'échelle intégrale. La répartition de la première est largement décrite dans la Section 4.1. En ce qui concerne la deuxième grandeur, divers auteurs suggèrent d'estimer cette échelle à partir d'une valeur unique liée aux caractéristiques géométriques du mobile (Khan *et al.*, 2005 ; Kresta and Wood, 1993 ; Sheng *et al.*, 2000 ; Zhou et Kresta, 1996). Certains la prennent égale au dixième du diamètre du mobile ($d/10$), d'autres à la moitié de la hauteur de la pale ($W/2$). C'est d'ailleurs l'approche que nous avons adoptée dans la Section 4.1 pour estimer l'échelle de Taylor à partir de l'échelle intégrale et des moyennes quadratiques de fluctuation de vitesse (Relation III-8). Cependant, vu le caractère non homogène de l'écoulement turbulent au sein d'une cuve agitée, il semble peu réaliste de considérer une valeur constante de l'échelle intégrale. On peut s'attendre, en effet, à ce que la taille des tourbillons énergétiques soit plus petite dans la zone balayée par le mobile et dans le jet à la sortie des pales que dans la zone située à proximité de la surface libre du liquide. Considérer une valeur constante de Λ pourrait donc conduire à une estimation erronée de ε dans certaines zones de l'écoulement. Notons cependant que cette remarque ne remet pas en cause les conclusions faites à la section 4.1 ci-avant concernant la résolution suffisante de nos mesures pour estimer la totalité de l'énergie cinétique turbulente car, comme nous l'observerons dans les résultats présentés ci-dessous, le dixième du diamètre du mobile correspond à la valeur minimale de l'échelle intégrale. Or, cette valeur intervient au numérateur de la Relation III-8 et donne donc soit une estimation correcte de l'échelle de Taylor (zone balayée par le mobile et le jet) ou soit une sous-estimation (reste de l'écoulement).

La valeur locale de l'échelle intégrale Λ est calculée en chaque point du plan de mesure en intégrant la fonction d'auto corrélation R_{ii} des champs de fluctuation de vitesse mesurés par P.I.V.. La fonction d'autocorrélation est définie par la Relation III-16 :

$$R_{ii} = \frac{u_i'(M)u_i'(M + dx_i)}{\sqrt{u_i'^2(M)}\sqrt{u_i'^2(M + dx_i)}} \quad (\text{III-16})$$

$$\Lambda_i = \int_0^{+\infty} R_{ii}(M, dx_i) dx_i \text{ pour } i=x \text{ et } y \quad (\text{III-17})$$

$$\Lambda_z = (\Lambda_x \Lambda_y)^{1/2} \quad (\text{III-18})$$

$$\Lambda = (\Lambda_x^2 + \Lambda_y^2 + \Lambda_z^2)^{1/2} \quad (\text{III-19})$$

Les mesures P.I.V. disponibles nous permettent de calculer, en chaque point du plan vertical, les fonctions R_{xx} et R_{yy} et d'en déduire les longueurs intégrales correspondantes Λ_x et Λ_y . Ne disposant pas des champs de la composante tangentielle u'_z dans la direction perpendiculaire au plan du laser, il n'est pas possible de mesurer directement la fonction d'auto corrélation associée R_{zz} . La longueur intégrale dans cette direction z est donc estimée par la moyenne géométrique des longueurs intégrales dans les deux autres directions, en suivant l'exemple des travaux de Gabriele *et al.* (2009). La longueur intégrale « globale » est la moyenne quadratique de ses trois composantes.

Avant de présenter la répartition spatiale de l'échelle intégrale, deux remarques s'imposent. La première est que pour un point donné du plan de mesure, la fonction d'auto corrélation peut être calculée dans deux directions opposées (pour R_{xx} : vers la gauche ou vers la droite, pour R_{yy} : vers le haut ou vers le bas). On obtient donc en chaque point deux valeurs pour chaque échelle intégrale ($\Lambda_{x,droite}$, $\Lambda_{x,gauche}$, $\Lambda_{y,bas}$, $\Lambda_{y,haut}$). La valeur utilisée dans les Relations III-18 et III-19 est la moyenne arithmétique (ex : $\Lambda_x = 0.5(\Lambda_{x,droite} + \Lambda_{x,gauche})$).

La seconde remarque porte sur la Relation III-17. Théoriquement, la fonction d'auto corrélation doit être intégrée sur une demi-droite infinie. Or notre domaine est par définition fini car limité par les parois de la cuve. C'est pourquoi, nous avons ajusté une fonction exponentielle décroissante sur les fonctions d'auto corrélation obtenues en chaque point du plan (Figure III-46) :

$$R_{ii} = \exp\left(\frac{-x_i}{\Lambda_i}\right) \quad (\text{III-20})$$

Le paramètre variable Λ_i de cette fonction est ajusté par la méthode des moindres carrés. On obtient donc ainsi directement la longueur intégrale dans la direction i (Relations III-17 et III-20).

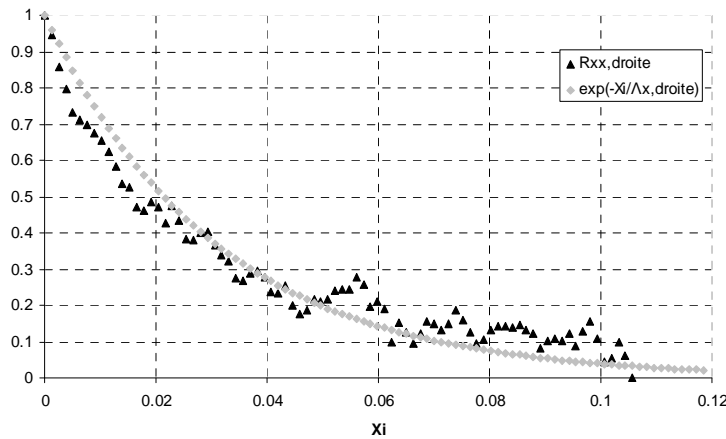


Figure III-46 : Illustration de l'ajustement d'une fonction exponentielle (♦) décroissante sur les points expérimentaux de la fonction d'auto-corrélation $R_{xx,droite}$ (▲) obtenue au point ($x=-0.05$ m, $y=0.04$ m).

Les Figures III-47 et III-48 présentent, respectivement pour le mobile TTP 125 et le mobile EE 150, la répartition spatiale de la longueur intégrale à la vitesse de rotation N_{js} . Un masque a de nouveau été appliqué sur la zone balayée par le mobile et sur la zone située hors de la cuve. La longueur intégrale est exprimée en m sur les figures de gauche, elle est normée par le diamètre du mobile sur les figures du milieu et elle est normée par la hauteur de la pale du mobile sur les figures de droite. Les Figures III-47 et III-48 confirment que les deux mobiles ne sont pas caractérisés chacun par une seule valeur de longueur intégrale mais par toute une gamme de valeurs. Pour les deux mobiles, les valeurs les plus faibles de la longueur intégrale, de l'ordre de 1 cm, sont relevées dans le jet à la sortie des pales, dans la partie ascendante de la boucle de recirculation supérieure et dans la zone d'aspiration située au-dessus des pales. Les valeurs les plus élevées, de l'ordre de 5 à 6 cm, sont observées dans le centre de la boucle de recirculation supérieure et dans la zone proche de la surface libre du liquide. Des valeurs intermédiaires, de l'ordre de 3-4 cm, sont observées dans le reste de la boucle de recirculation supérieure.

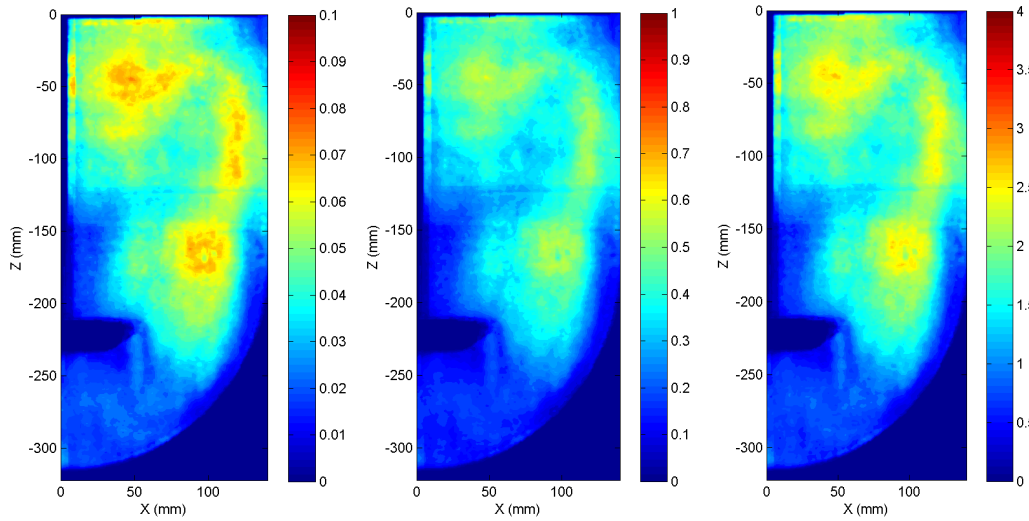


Figure III-47 : Mobile TTP 125 : Répartition spatiale de l'échelle intégrale globale Λ obtenue à la vitesse de rotation N_{js} : à gauche, valeurs exprimées en m ; au milieu, valeurs normées par le diamètre du mobile ($d=125$ mm) ; à droite, valeurs normées par la hauteur de pale ($W=27$ mm).

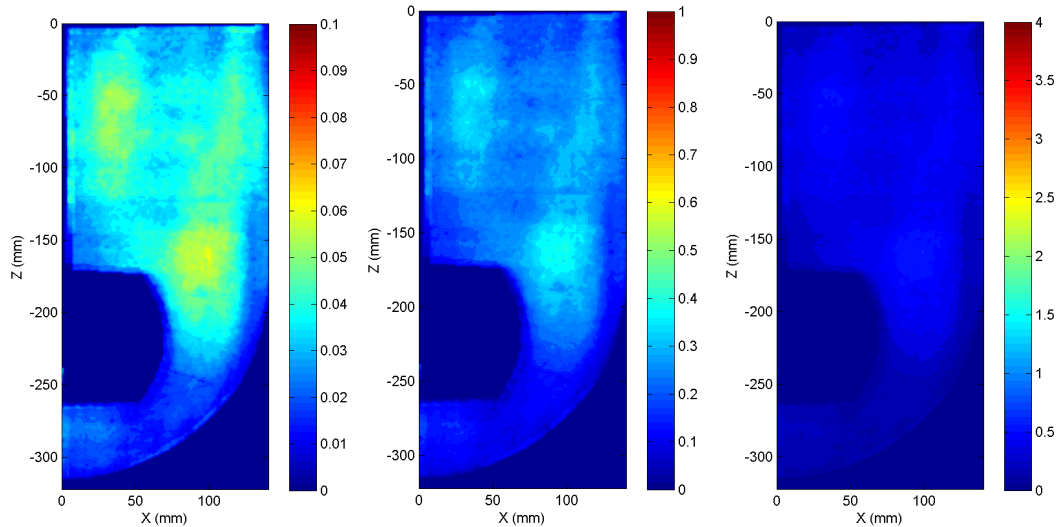


Figure III-48 : Mobile EE 150 : Répartition spatiale de l'échelle intégrale globale Λ obtenue à la vitesse de rotation N_{js} : à gauche, valeurs exprimées en m ; au milieu, valeurs normées par le diamètre du mobile ($d=125$ mm) ; à droite, valeurs normées par la hauteur de pale ($W=95$ mm).

La répartition des valeurs normées par le diamètre du mobile montrent qu'on obtient, pour les deux mobiles, une valeur de l'ordre de $d/10$ dans la zone du jet, ce qui est en accord avec les valeurs généralement utilisées dans la littérature. Dans cette même zone, on obtient également un $ratio \Lambda/W = 0.5$ pour le mobile TTP 125. Un $ratio$ nettement plus faible (≈ 0.2) est observé pour le mobile EE 150. Cette différence provient de la hauteur particulièrement grande des pales du mobile EE 150 (= 95 mm) par rapport aux mobiles les plus souvent étudiés dans la littérature.

Les résultats obtenus dans ce travail sont tout à fait comparables à ceux présentés par Bugay (1998) pour un mobile A310 (Lighthnin). La comparaison des Figures III-47 et III-49 met en évidence un même type de profil radial obtenu pour les mobiles TTP 125 et A310 sous la pale du mobile. Ce profil se caractérise par une première zone à faible valeur sous les pales du mobile suivie d'une zone à plus forte valeur dans la partie de la boucle de recirculation.

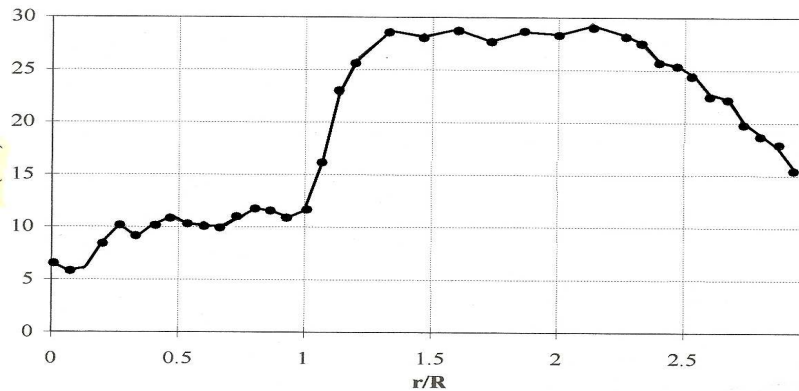


Figure III-49 : Profil radial de l'échelle intégrale (mm) obtenue à 5 mm sous le mobile A310 ($d/T=0.33$, $Y/T=0.33$), Bugay (1998).

4.2.3 Taux de dissipation de l'énergie cinétique turbulente

Connaissant en chaque point du plan la valeur de l'énergie cinétique turbulente par la Relation III-4 et la valeur de l'échelle intégrale par la Relation III-19, nous sommes en mesure d'estimer la répartition spatiale du taux de dissipation de l'énergie cinétique turbulente par la Relation III-15. Les Figures III-50 et III-51 présentent ces répartitions respectivement pour le mobile TTP 125 et EE 150. Les résultats sont à nouveau présentés en valeur absolue à la vitesse de rotation N_{js} (figure de gauche) et en valeur normée par $N^3 d^2$ (figure de droite). Un masque est appliqué sur la zone balayée par le mobile et sur la zone située hors de la cuve.

À la vitesse de rotation N_{js} , les deux mobiles présentent un taux de dissipation de l'énergie cinétique turbulente maximal dans le jet à la sortie des pales, un niveau intermédiaire d'énergie cinétique turbulente dans la partie ascendante de la boucle de recirculation supérieure ainsi que dans la zone d'aspiration au-dessus des pales et un niveau nettement plus faible dans le reste de l'écoulement. Logiquement, vu l'Expression III-15, l'énergie cinétique turbulente et son taux de dissipation ont des distributions spatiales assez similaires. Dès lors, on observe de nouveau pour le mobile TTP 125 une zone aux valeurs maximales composées de deux lobes.

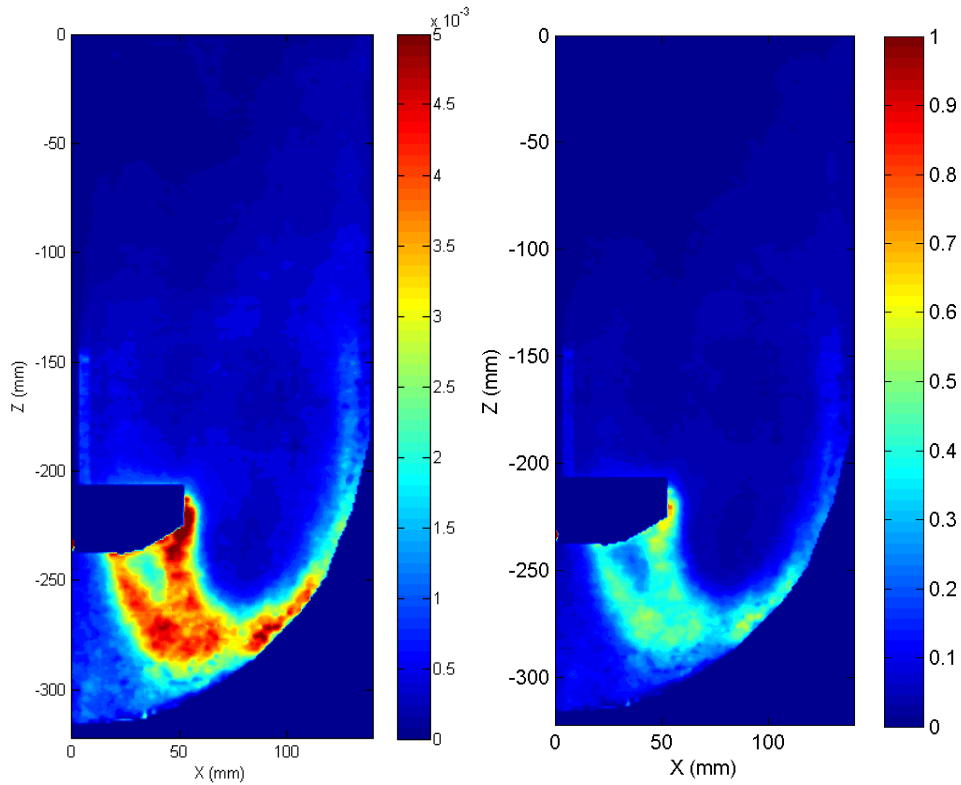


Figure III-50 : Mobile TTP 125 : Répartition spatiale du taux de dissipation de l'énergie cinétique turbulente estimée par la méthode dimensionnelle (Relation III-15). (Gauche) : valeurs absolues ($\text{m}^2 \text{s}^{-3}$) calculées à la vitesse de rotation N_{js} (Droite) valeurs normées par $N^3 d^2$.

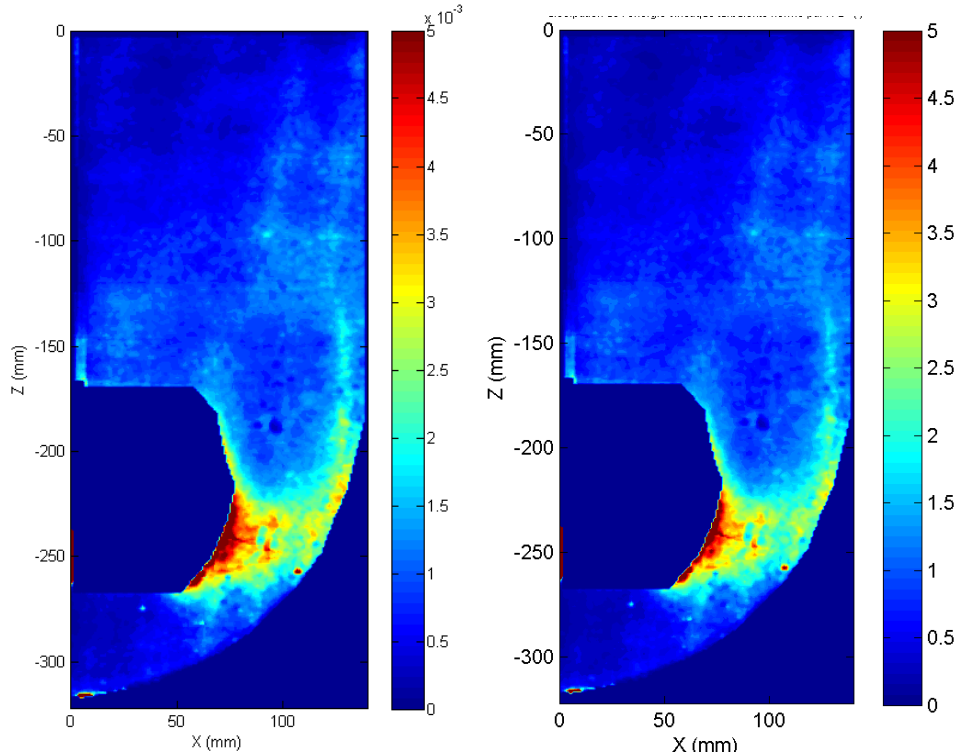


Figure III-51 : EE 150 : Répartition spatiale du taux de dissipation de l'énergie cinétique turbulente estimée par la méthode dimensionnelle (Relation III-15). (Gauche) : valeurs absolues ($\text{m}^2 \text{s}^{-3}$) calculées à la vitesse de rotation N_{js} (Droite) valeurs normées par $N^3 d^2$.

Une même gamme de valeurs est observée pour les deux mobiles lorsqu'ils tournent à leur vitesse de rotation N_{js} . Cette observation est d'ailleurs confirmée par les valeurs des

percentiles des distributions numériques de ε présentées au Tableau III-3. Par contre, en valeurs normées, les deux mobiles présentent des distributions de valeurs de ε extrêmement différentes. Les valeurs normées maximales générées par le mobile TT125 ne dépassent pas $0.6 N^3 d^2$ tandis que celles produites par le mobile EE 150 sont de l'ordre de $5 N^3 d^2$.

Les distributions spatiales et numériques du taux de dissipation de l'énergie cinétique turbulente obtenues par la méthode dimensionnelle ont été validées sur base de deux types de comparaison :

- La première consiste à comparer les percentiles de la distribution numérique aux valeurs obtenues lorsque l'on estime un taux de dissipation moyen ou « maximal » à partir de la puissance globale dissipée, calculée à partir de la mesure du couple exercé sur l'axe de rotation du mobile. Cette comparaison permet de valider les ordres de grandeur obtenus par la méthode dimensionnelle ;
- La seconde consiste à comparer la répartition spatiale des valeurs de ε obtenue par la méthode dimensionnelle à celle obtenue par la méthode directe. Cette comparaison est possible pour le mobile TTP 125 grâce aux mesures P.I.V. haute résolution réalisées par Delafosse *et al.* (2011) dans la même cuve, avec le même mobile et à la même vitesse de rotation. Cette comparaison permet de valider l'allure de la distribution spatiale de ε obtenue par méthode dimensionnelle.

La comparaison des valeurs des percentiles de la distribution numérique aux valeurs obtenues lorsque l'on estime un taux de dissipation moyen ou « maximale » à partir de la puissance globale dissipée est présentée au Tableau III-3 pour deux vitesses de rotation.

Tableau III-3 : Comparaison des valeurs moyennes et maximales du taux de dissipation de l'énergie cinétique turbulente (m^2s^{-3}) estimées par P.I.V. ou calculées à partir de la puissance globale dissipée.

		$P_{50, \varepsilon}$	$\frac{P}{\rho_l V}$	$P_{95, \varepsilon}$	$\frac{P}{\rho_l d^3}$
TTP 125	N_{js}	3.42×10^{-4}	3.29×10^{-4}	3.32×10^{-3}	3.37×10^{-3}
	$2 N_{js}$	3.08×10^{-3}	2.80×10^{-3}	27.08×10^{-3}	28.62×10^{-3}
EE 150	N_{js}	8.77×10^{-4}	3.01×10^{-4}	2.56×10^{-3}	1.78×10^{-3}
	$2.5 N_{js}$	8.76×10^{-3}	4.70×10^{-3}	33.21×10^{-3}	27.9×10^{-3}

Le percentile 50 de la distribution numérique (colonne 3) est comparé au taux moyen de dissipation estimé en divisant la puissance globale dissipée par la densité et le volume total de la cuve (colonne 4). Le percentile 95 (colonnes 5) est comparé au taux « maximal » de dissipation obtenus en divisant la puissance globale dissipée par la densité et par le diamètre du mobile au cube (colonne 6). Pour le mobile TTP 125, un bon accord est observé entre les valeurs du percentile 50 et le taux moyen de dissipation, ainsi qu'entre le percentile 95 et le taux « maximal » de dissipation estimé par $P/\rho_l d^3$. Pour le mobile EE 150, un *ratio* deux est observé entre les valeurs du percentile 50 et le taux moyen de dissipation. Par contre, un nettement meilleur accord est observé entre le percentile 95 et la valeur estimée par $P/\rho_l d^3$.

Même si l'accord entre les valeurs obtenues à partir des mesures globales et locales est moins bon pour le mobile EE 150 que pour le mobile TTP 125, il apparaît que dans tous les cas les résultats restent tout à fait du même ordre de grandeur. Cette comparaison valide donc l'ordre de grandeur des valeurs du taux de dissipation calculées par la méthode dimensionnelle.

Les répartitions spatiales de ε calculées par la méthode directe par Delafosse *et al.* (2011) sont basées sur des mesures 2D P.I.V. réalisées dans le plan vertical qui passe par l'axe de rotation du mobile et forme un angle de 45° avec le plan passant par les contre-pales. Les mesures dans ce plan ont été répétées en augmentant progressivement la résolution spatiale, en rapprochant la caméra du plan de mesure, ce qui impliquait de réduire la taille de la zone étudiée. Les répartitions spatiales de ε obtenues par Delafosse *et al.* (2011) à quatre résolutions spatiales différentes (respectivement $1263\ \mu\text{m}$, $493\ \mu\text{m}$, $360\ \mu\text{m}$ et $234\ \mu\text{m}$) sont présentées à la Figure III-53. La répartition obtenue par la méthode dimensionnelle sur base des mesures réalisées dans cette thèse avec une résolution spatiale de $1250\ \mu\text{m}$ est également présentée sur cette figure afin de faciliter la comparaison entre les deux méthodes.

Comme mentionné précédemment, (Section 4.2.1), il apparaît que les valeurs de ε calculées par la méthode directe dépendent fortement de la résolution spatiale des mesures. Le Tableau III-4 qui caractérise les valeurs maximales dans la zone de mesures *via* le percentile 95 des distributions de ε , montre qu'un facteur quasi de 10 est observé entre la valeur du percentile 95 obtenu à une résolution spatiale égale à $1263\ \mu\text{m}$ et la valeur obtenue à une résolution spatiale égale à $234\ \mu\text{m}$. Ce même tableau permet également de comparer les ordres de grandeur des valeurs calculées par la méthode directe et celles calculées par la méthode dimensionnelle. Il apparaît que les valeurs maximales calculées par la méthode dimensionnelle sont comprises, à la vitesse de rotation N_{js} , entre celles obtenues par la méthode directe à une résolution de $1263\ \mu\text{m}$ et de $493\ \mu\text{m}$. À la vitesse de rotation $2\ N_{js}$, elles sont comprises entre celles obtenues par la méthode directe à la résolution de $493\ \mu\text{m}$ et de $360\ \mu\text{m}$. Il semblerait donc que la méthode dimensionnelle basée sur des mesures P.I.V. réalisées avec une résolution spatiale de $1.25\ \text{mm}$ sous-estime systématiquement les valeurs de ε puisque des valeurs plus élevées de ε sont obtenues par la méthode directe lorsque la résolution spatiale est de $234\ \mu\text{m}$. Cependant, et sans remettre en cause la qualité des travaux de Delafosse *et al.* (2011), de Baldi *et al.* (2002) ou ceux d'autres équipes, nous nous interrogeons sur l'évolution des valeurs de ε obtenues par la méthode directe avec la résolution spatiale des mesures. En effet, toutes ces équipes ont observé que les valeurs de ε augmentaient selon une loi en puissance lorsque la résolution spatiale des mesures P.I.V. était améliorée (Figure III-52). Cette augmentation entraîne une diminution de la taille minimum de l'échelle de Kolmogorov calculée. Il en résulte, qu'à ce jour, aucune équipe n'a montré que les valeurs locales de ε estimées par la méthode directe tendaient vers une valeur constante en deçà d'une certaine résolution spatiale des mesures P.I.V.. Dès lors, on peut se demander si cette augmentation de ε est réellement due à une information plus importante mesurée à petite échelle ou si elle est due au bruit plus important qui entache les mesures. Sur base de cette discussion, il semble difficile de comparer les résultats numériques obtenus par les deux méthodes puisqu'aucune des deux ne peut être prise comme méthode de référence.

Tableau III-4 : Comparaison des valeurs maximales du taux de dissipation de l'énergie cinétique turbulente ($m^2 s^{-3}$) observées dans ce travail et dans l'étude de Delafosse et al. (2011) .

		TTP 125	Méthode dimensionnelle	Méthode directe			
		Δ	1250 μm	1263 μm	493 μm	360 μm	234 μm
N_{js}	$P_{95, \varepsilon}$		3.32×10^{-3}	1.35×10^{-3}	4.17×10^{-3}	5.52×10^{-3}	12.8×10^{-3}
$2 N_{js}$	$P_{95, \varepsilon}$		27.1×10^{-3}	6.1×10^{-3}	15.4×10^{-3}	22.9×10^{-3}	45.6×10^{-3}

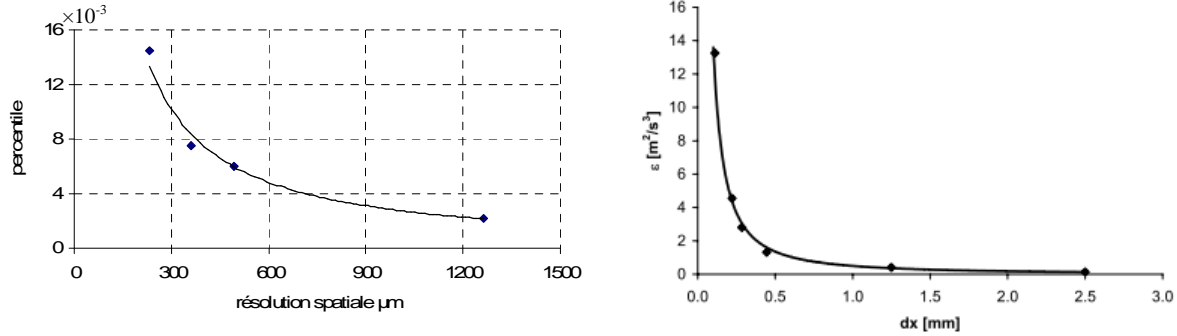


Figure III-52 : Évolution du taux de dissipation de l'énergie cinétique turbulente en fonction de la résolution spatiale des mesures (gauche) Evolution du percentile 99 de la distribution obtenue pour le mobile TTP 125 à 50 rpm (droite) Evolution de la valeur moyenne dans le jet des pales d'un mobile de type hélice A310 (Lightnin, $d/T=0.33$. $Y/T=0.33$. $N=2165$ rrm. Baldi et al., 2002).

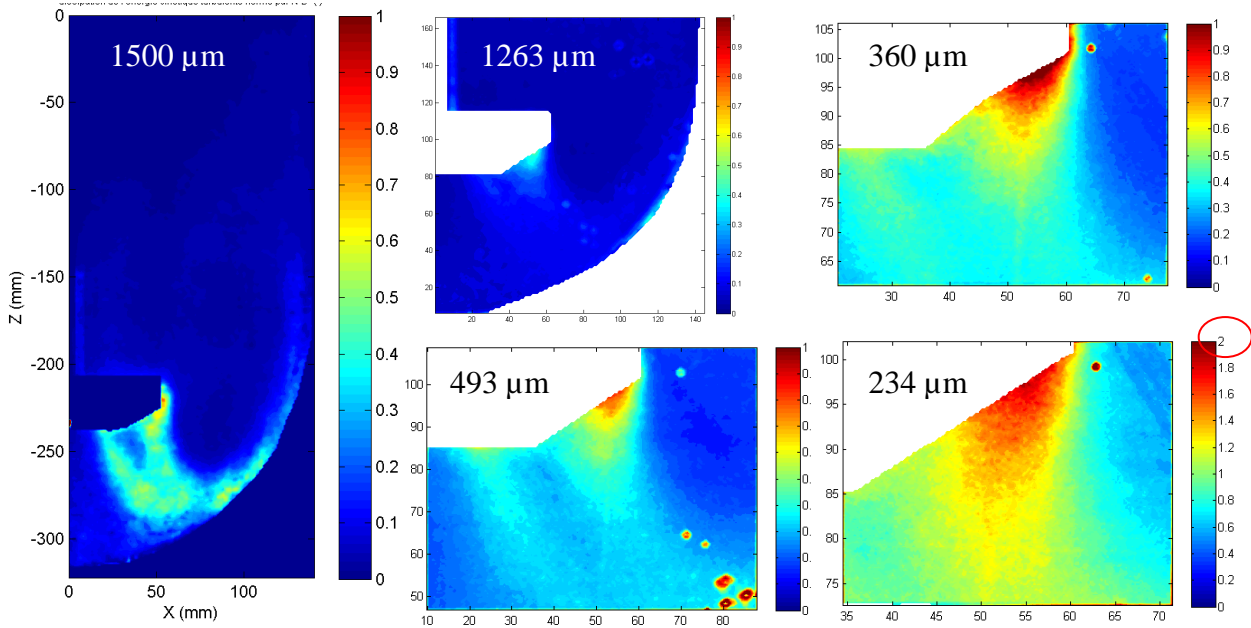


Figure III-53 : Comparaison de la répartition du taux de dissipation de l'énergie cinétique turbulente ($m^2 s^{-3}$) observées dans ce travail et dans l'étude de Delafosse et al. (2011).

Par contre, si on fait abstraction des valeurs numériques du taux de dissipation, l'examen des distributions présentées sur la partie droite de la Figure III-53 montre que l'allure de la répartition de ε dans le jet à la sortie des pales n'est pas influencée par la résolution des mesures P.I.V.. En effet, toutes les distributions présentent des valeurs maximales de ε entre l'extrémité de la pale et la moitié supérieure de sa partie inclinée. Une deuxième zone caractérisée par des valeurs élevées de ε est observée à proximité du milieu du bord inférieur de la pale. Le reste du jet se caractérise par des niveaux intermédiaires de ε . Les valeurs de ε observées dans le reste de l'écoulement visible sur les distributions sont nettement plus

faibles. La distribution présentée sur la partie gauche de la Figure III-53 montre que le même type de profil est obtenu dans les résultats de la méthode dimensionnelle. Cette similitude entre l'allure des distributions calculées par la méthode directe et par la méthode dimensionnelle permet de valider la répartition spatiale de ε obtenue par la méthode dimensionnelle, indépendamment des écarts qui peuvent exister entre les valeurs calculées par les deux méthodes.

En conclusion, la comparaison des valeurs de ε calculées par la méthode dimensionnelle avec celles déduites de la puissance dissipée permet de valider les ordres de grandeur obtenus, tandis que la comparaison de ces mêmes valeurs avec les résultats obtenus par la méthode directe permet de valider l'allure de sa distribution spatiale.

Nous terminerons cette section consacrée à la distribution du taux de dissipation en vérifiant que l'hypothèse de symétrie de révolution peut de nouveau être appliquée. Les Figures III-54 et III-55 montrent effectivement que les profils axiaux de $\varepsilon / N^3 d^2$ mesurés dans les 5 plans verticaux situés à différents angles par rapport aux contre-pales se superposent et coïncident avec le profil obtenu en calculant leur moyenne.

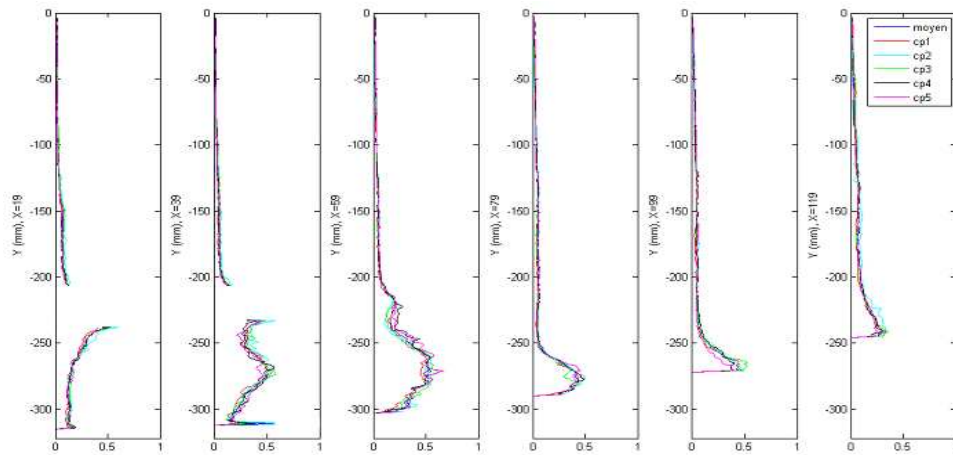


Figure III-54 : Mobile TTP 125 : Comparaison des profils axiaux de $\varepsilon / N^3 d^2$ obtenus dans les différents plans verticaux avec les profils moyens (bleu foncé) obtenus en moyennant les résultats acquis dans les 5 plans.

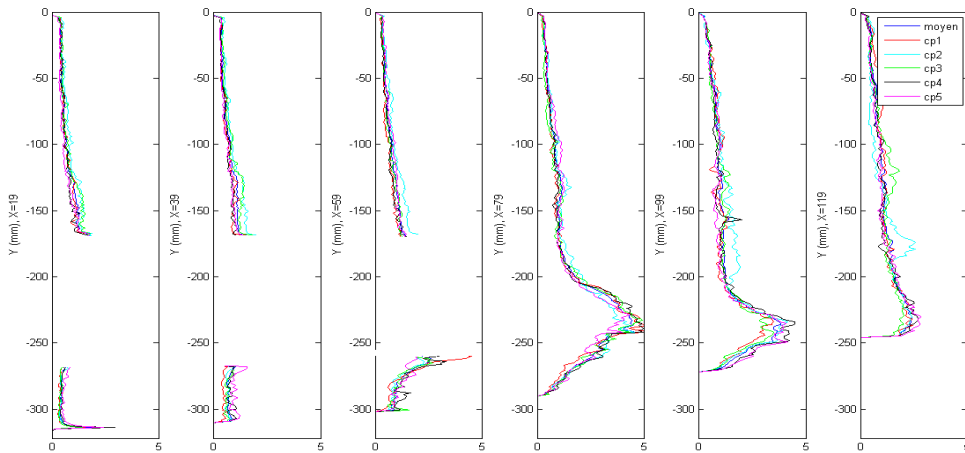


Figure III-55 : Mobile EE 150 : Comparaison des profils axiaux de $\varepsilon / N^3 d^2$ obtenus dans différents plans verticaux avec les profils moyens (bleu foncé) obtenus en moyennant les résultats acquis dans les 5 plans.

4.3 Synthèse

L'analyse des caractéristiques des champs turbulents générés par les mobiles TTP 125 et EE 150, telles que l'énergie cinétique turbulente et son taux de dissipation, met en évidence que les deux mobiles génèrent des distributions spatiales de ces grandeurs similaires lorsqu'ils tournent à leur vitesse de rotation N_{js} (ou à des multiples de celles-ci). Ces distributions sont caractérisées par des valeurs maximales dans la zone balayée par le mobile, dans le jet à la sortie de leurs pales et dans la partie ascendante de la boucle de recirculation et par des valeurs nettement plus faibles dans le reste de l'écoulement. Les résultats obtenus sont en bon accord avec les résultats de la littérature ainsi qu'avec des résultats déduits de grandeurs globales mesurées comme la puissance globale dissipée.

Malgré cette similitude au niveau des distributions spatiales observées à N_{js} , les résultats présentés dans cette section montrent que les mobiles ont des comportements intrinsèquement très différents. En effet, les distributions numériques des valeurs normées de l'énergie cinétique turbulente et de son taux de dissipation présentent des gammes de valeurs très distinctes pour les deux mobiles. Par exemple, les valeurs maximales normées de k et ε valent respectivement $0.075 \pi^2 N^2 d^2$ et $5 N^3 d^2$ pour le mobile EE 150 alors qu'elles ne valent que $0.025 \pi^2 N^2 d^2$ et $0.6 N^3 d^2$ pour le mobile TTP 125.

5 Contraintes mécaniques générés au sein de l'écoulement turbulent

Dans cette section, nous allons tenter de caractériser les contraintes mécaniques générées au sein de l'écoulement turbulent. L'approche classique consiste à calculer les contraintes mécaniques au sein de l'écoulement en multipliant les gradients de vitesse par la viscosité du fluide. Les équations relatives à cette approche sont reprises ci-dessous :

$$\tau_{xx} = \mu \frac{\partial u_x}{\partial x}, \tau_{yy} = \mu \frac{\partial u_y}{\partial y}, \tau_{zz} = \mu \frac{\partial u_z}{\partial z} \quad (III-21)$$

$$\tau_{xy} = \mu \frac{\partial u_x}{\partial y}, \tau_{xz} = \mu \frac{\partial u_x}{\partial z}, \tau_{yz} = \mu \frac{\partial u_y}{\partial z} \quad (III-22)$$

Les Relations III-21 correspondent aux calculs des contraintes normales tandis que les Relations III-22 correspondent aux calculs des contraintes de cisaillement. Ces expressions peuvent être aisément appliquées pour calculer les contraintes mécaniques au sein d'un écoulement laminaire et stationnaire. Ce type d'écoulement se rencontre par exemple entre les deux cylindres d'un viscosimètre ; ce qui fait d'ailleurs la célébrité de cette approche. Par contre, dans un écoulement turbulent, tel que celui rencontré dans une cuve agitée, ces expressions sont difficilement applicables car il faudrait les utiliser sur les champs instantanés. Cependant, tout comme le taux de dissipation de l'énergie cinétique turbulente, le résultat obtenu dépendra de la résolution spatiale des mesures puisqu'il implique le calcul de dérivées spatiales.

Pour pallier cette difficulté, dans le cas où l'écoulement turbulent est décrit en utilisant une approche de Reynolds, une deuxième méthode a été proposée pour caractériser les contraintes mécaniques (Elias *et al.*, 1995, Galletti *et al.*, 2004, Joshi *et al.*, 1996). Cette méthode

consiste à déterminer les contraintes normales et de cisaillement en multipliant la moyenne temporelle des produits des composantes fluctuantes de la vitesse par la masse volumique du fluide :

$$\tau_{xx} = \rho_l \overline{u_x' u_x'}, \tau_{yy} = \rho_l \overline{u_y' u_y'}, \tau_{zz} = \rho_l \overline{u_z' u_z'} \quad (III-23)$$

$$\tau_{xy} = \rho_l \overline{u_x' u_y'}, \tau_{xz} = \rho_l \overline{u_x' u_z'}, \tau_{yz} = \rho_l \overline{u_y' u_z'} \quad (III-24)$$

Ces expressions sont plus généralement appelées dans la littérature les composantes du tenseur des contraintes de Reynolds. Tout comme pour les Expressions III-21 et III-22, la dimension de la grandeur calculée est celle d'un transfert de moment à travers l'écoulement. Dans le cas des Relations III-23 et III-24, le transfert calculé est associé aux composantes fluctuantes de la vitesse. Les valeurs calculées par cette méthode ne dépendent pas de la résolution spatiale des mesures P.I.V. car, tout comme dans le cas de l'énergie cinétique turbulente, l'ensemble du spectre est mesuré si la résolution spatiale est inférieure à l'échelle de Taylor. Ce point a été vérifié dans la Section 4.1.

La description de l'écoulement turbulent proposée par Venkat *et al.* (1995) permet de mieux comprendre à quoi correspondent les contraintes normales et de cisaillement. Venkat *et al.* décrivent l'écoulement turbulent comme la superposition de zones de pur cisaillement, typiquement les tourbillons, où des contraintes de cisaillement seront générées (les deux schémas de gauche de la Figure III-56) et de zones de contraction ou de divergence, au sein desquelles des contraintes normales seront produites (les deux schémas de droites de la Figure III-56).

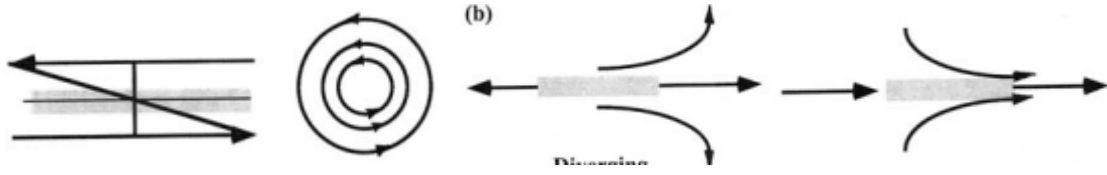


Figure III-56 : Représentation de l'écoulement turbulent proposée par Venkat *et al.* (1998) : zones de pur cisaillement où sont générées des contraintes de cisaillement (deux figures de gauche) et zones de contraction ou de divergence qui entraînent des contraintes normales (deux figures de droite).

Les répartitions spatiales des contraintes normales et de cisaillement obtenues à la vitesse de rotation N_{js} sont présentées aux Figures III-57 et III-58. Les percentiles de leurs distributions numériques sont repris dans le Tableau III-5. Vu l'incertitude relative aux valeurs mesurées de fluctuation de la vitesse dans la direction Z (voir Section 2.2), la contrainte normale dans cette même direction est estimée par l'expression :

$$\tau_{zz} = \rho_l \overline{u_z' u_z'} = \rho_l \frac{1}{2} (\overline{u_x' u_x'} + \overline{u_y' u_y'}) \quad (III-25)$$

Les résultats relatifs aux contraintes de cisaillement τ_{xz} et τ_{yz} ne seront pas présentés car il n'a pas été possible de valider les produits croisés dans lesquelles intervient la composante fluctuante tangentielle u_z' . De plus, il n'est pas possible de déduire ces contraintes de cisaillement de la distribution de la contrainte de cisaillement τ_{xy} car comme l'indiquent les travaux de Bugay (1998), réalisés avec un mobile A310 (Lightnin), les produits croisés des fluctuations de vitesse présentent des ordres de grandeur similaires mais des répartitions spatiales dans l'écoulement différentes.

Les contraintes normales sont maximales dans le jet à la sortie des pales des mobiles TTP 125 et EE 150. Suivant l'orientation de la contrainte, elles présentent des valeurs maximales de l'ordre de 1.2 à 2 N m⁻². Elle conserve des valeurs intermédiaires, comprises entre 0.6 et à 0.8 N m⁻² (zone en turquoise sur les Figures III-57 et III-58) dans la partie ascendante de la boucle de recirculation supérieure. Elles présentent des valeurs nettement plus faibles dans le reste de l'écoulement. Puisque les contraintes normales sont calculées à partir des moyennes quadratiques de fluctuation de la vitesse, tout comme l'énergie cinétique turbulente, la zone aux valeurs maximales en forme de double-lobes est de nouveau observée pour le mobile TTP 125. Le Tableau III-5 présente les valeurs des percentiles des distributions numériques des contraintes normales et de cisaillement générées par les deux mobiles à leur vitesse de rotation N_{js} ainsi qu'au double de cette vitesse ($2 N_{js}$). La comparaison des valeurs relatives aux deux mobiles montrent de plus qu'ils génèrent des contraintes normales d'intensité similaires.

Tableau III-5 : Percentiles 25, 50, 75, 90 et 99 des distributions des contraintes normales et de cisaillement ($N m^{-2}$) générées par les mobiles TTP 125 et EE 150 à leur vitesse de rotation N_{js} et à $2 N_{js}$.

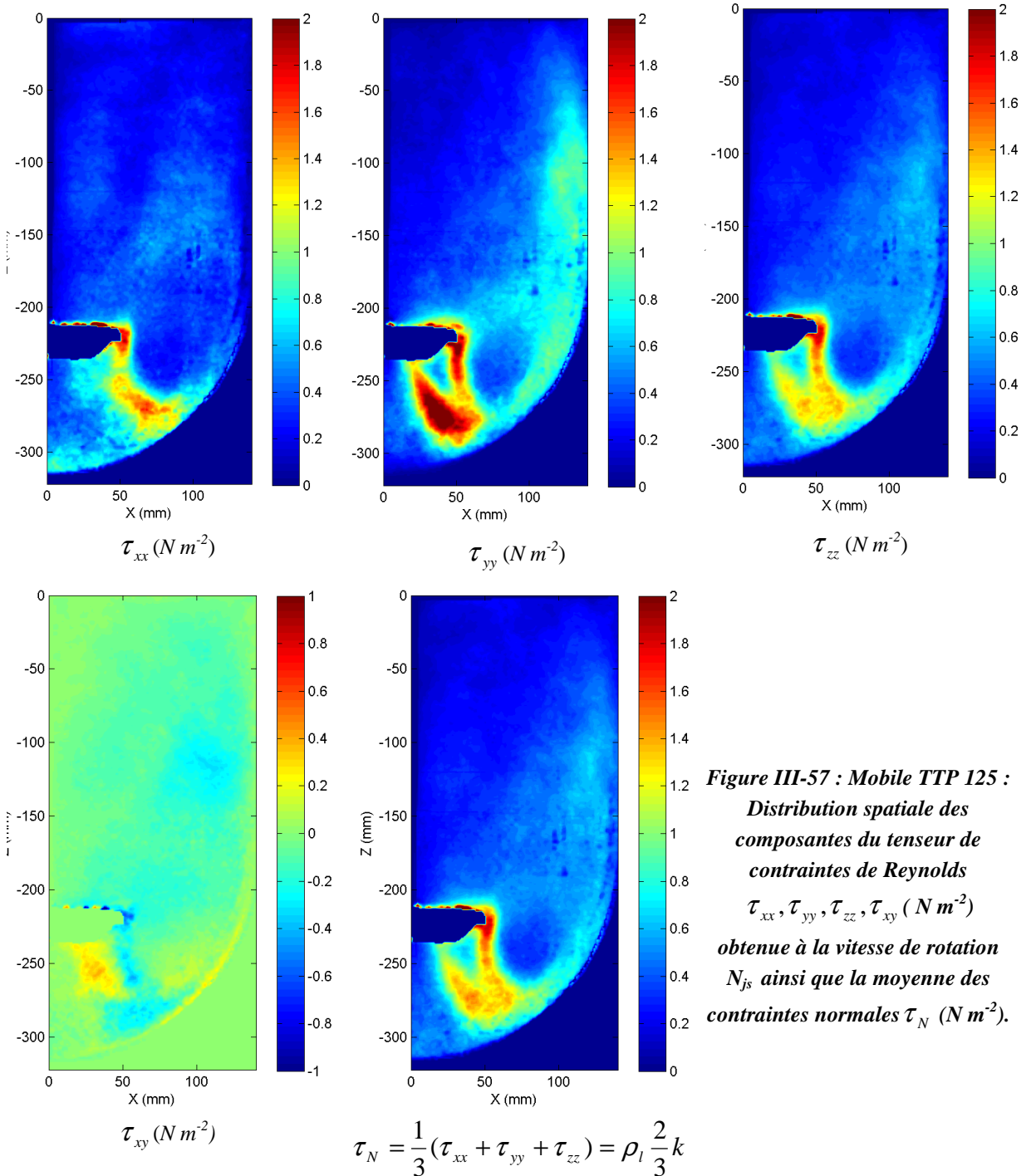
TTP 125 N_{js}	P_{25}	P_{50}	P_{75}	P_{90}	P_{99}	TTP 125 $2 N_{js}$	P_{25}	P_{50}	P_{75}	P_{90}	P_{99}
τ_{xx}	0.24	0.33	0.44	0.68	1.37	τ_{xx}	1.20	1.57	2.03	2.99	6.20
τ_{yy}	0.24	0.40	0.68	0.88	1.87	τ_{yy}	1.08	1.76	2.97	3.75	8.04
τ_{zz} et τ_N	0.25	0.39	0.53	0.75	1.38	τ_{zz} et τ_N	1.22	1.75	2.36	3.21	6.09
τ_{xy}	-0.12	-0.07	-0.02	0.03	0.23	τ_{xy}	-0.55	-0.33	-0.10	0.15	0.93
EE 150 N_{js}	P_{25}	P_{50}	P_{75}	P_{90}	P_{99}	EE 150 $2 N_{js}$	P_{25}	P_{50}	P_{75}	P_{90}	P_{99}
τ_{xx}	0.44	0.63	0.80	0.93	1.52	τ_{xx}	1.45	2.05	2.76	3.52	5.56
τ_{yy}	0.39	0.60	0.98	1.11	1.29	τ_{yy}	1.20	2.06	3.25	4.08	4.91
τ_{zz} et τ_N	0.43	0.65	0.85	0.97	1.33	τ_{zz} et τ_N	1.35	2.15	2.94	3.24	4.82
τ_{xy}	-0.21	-0.10	-0.02	0.02	0.08	τ_{xy}	-0.70	-0.29	-0.05	0.06	0.35

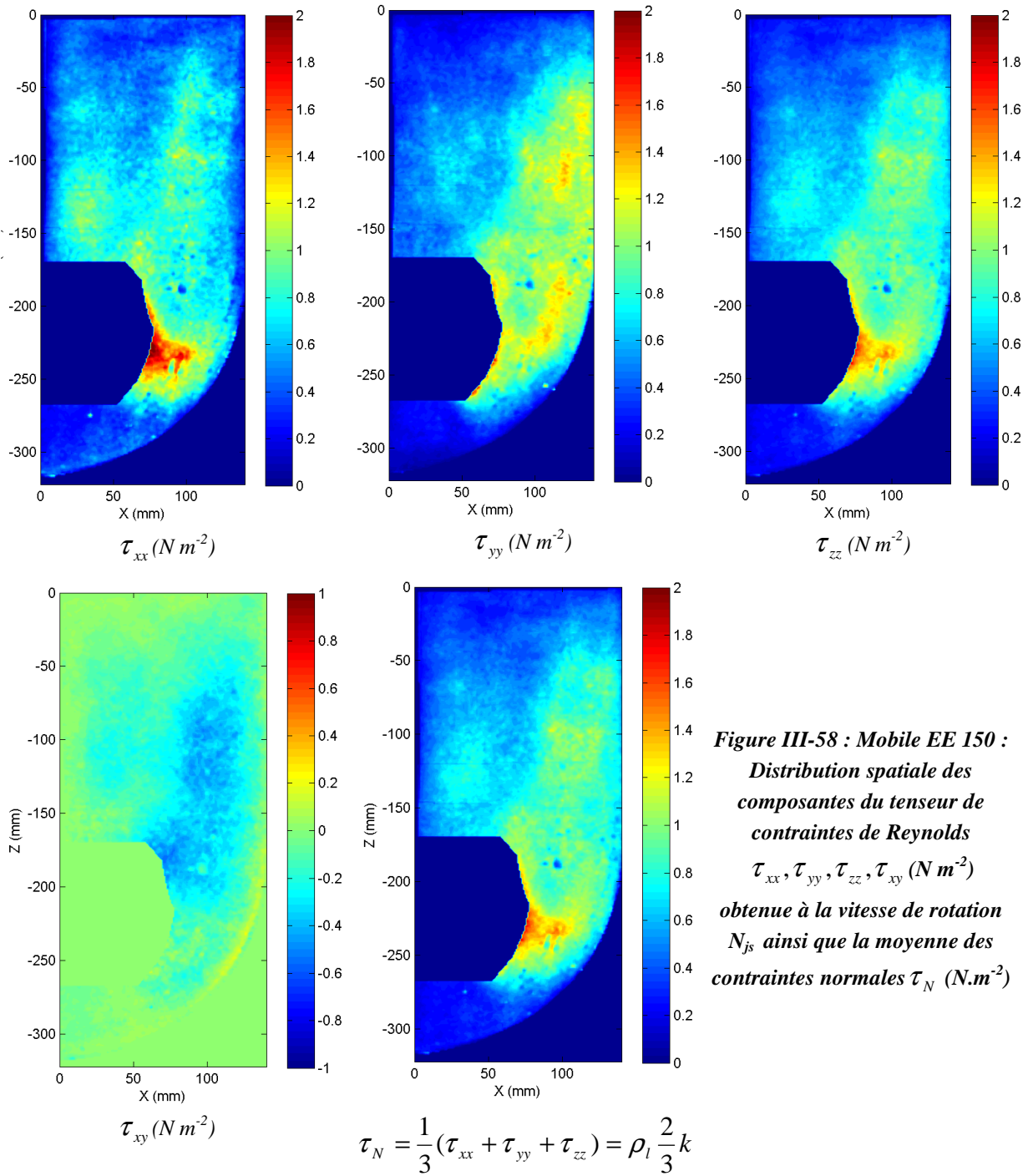
La contrainte de cisaillement τ_{xy} prend, dans certaines zones, des valeurs positives et, dans d'autres, des valeurs négatives. Ses valeurs sont maximales dans le jet à la sortie des pales et nettement plus faibles partout ailleurs. Les valeurs maximales sont nettement moins élevées que celles observées pour les contraintes normales. C'est pourquoi, dans la suite de ce travail, nous nous concentrerons sur les contraintes normales. Ce choix est par ailleurs justifié par le fait que les contraintes normales ont un impact potentiellement plus délétère que les contraintes de cisaillement. En effet, Gregoriades *et al.* (2000) et Godoy (2008) ont montré dans leurs travaux, qu'à même puissance dissipée, un écoulement divergent ou convergent produit des contraintes (normales) nettement plus dommageables pour les cellules animales qu'un écoulement purement cisailant.

Afin de résumer en une seule grandeur les contributions des composantes de la contrainte normale, une contrainte normale moyenne a été calculée :

$$\tau_N = \frac{1}{3}(\tau_{xx} + \tau_{yy} + \tau_{zz}) = \rho_l \frac{2}{3}k \quad (\text{III-26})$$

La relation ci-dessus met en évidence le lien qui existe entre la contrainte normale moyenne et l'énergie cinétique turbulente. L'approche adoptée ici pour étudier l'impact des contraintes mécaniques sur le développement cellulaire peut être justifiée par les travaux de Gadge *et al.* (2005) qui ont montré que, dans une cuve agitée, la taille de floccs ou la désactivation des enzymes pouvait être corrélée à la contrainte moyenne normale calculée à partir de l'énergie cinétique turbulente. Or, on peut s'attendre à ce que les contraintes mécaniques qui interagissent sur des floccs, des enzymes ou des cellules animales sur microporteurs soient de même nature.





6 Découpage de la cuve sur base du niveau de contraintes mécaniques

Si la valeur maximale de contraintes mécaniques supportées par les cellules animales est connue, il sera possible de comparer cette valeur à la distribution de la contrainte normale moyenne obtenue dans ce travail et de diviser la cuve en deux zones : l'une « problématique » pour le développement cellulaire et l'autre « non problématique ». Malheureusement, les choses ne sont pas aussi simples. La première grande difficulté rencontrée est la définition

d'une valeur limite. Les seules valeurs disponibles ont été déterminées dans des écoulements simples comme ceux rencontrés dans un écoulement entre deux parois parallèles (chambre d'écoulement, viscosimètre) ou qui présentent des convergences et divergences (écoulement en canaux). L'avantage de ce type de dispositif est sa simplicité, ce qui permet la résolution des équations de Navier-Stokes pour décrire l'écoulement étudié. Il est donc possible d'associer, en tout point de l'écoulement, une valeur de contrainte et de relier l'ensemble des valeurs relatives à l'écoulement à leur effet sur les cellules. Ce type de méthodologie présente cependant un inconvénient majeur. En effet, il n'y a aucune garantie que ces types d'écoulement soient représentatifs d'un écoulement turbulent dans une cuve agitée. Lors des études réalisées dans des chambres d'écoulement ou dans des viscosimètres, l'écoulement est purement cisaillant. Or, comme mentionné précédemment, Godoy (2008) a montré que ces écoulements sont, à même puissance dissipée, plus « doux » pour les cellules que des écoulements divergents ou convergents. Les études réalisées dans des canaux convergents et divergents ne sont pas représentatives non plus des contraintes rencontrées par les cellules dans une cuve agitée. En effet, dans les canaux convergents-divergents, les cellules ne sont généralement soumises qu'à un seul passage dans le rétrécissement, alors que dans une cuve agitée, elles sont soumises périodiquement à un passage dans une ou des zones à hautes contraintes mécaniques. Ce caractère périodique n'est donc pas pris en compte dans les études réalisées en canaux.

Les études réalisées dans des écoulements « modèles » (parois parallèles, canaux convergents-divergents) sont néanmoins loin d'être inutiles. Elles ont notamment montré que des cellules animales sur microporteurs étaient plus sensibles aux contraintes mécaniques générées au sein de l'écoulement que des cellules libres en suspension. Cette sensibilité accrue provient du fait qu'il faut une contrainte mécanique moindre pour décrocher une cellule animale de son microporteur (et la rendre ainsi inactive) que pour entraîner la lyse de la cellule. Des valeurs seuils de contraintes mécaniques de l'ordre de 1 N m^{-2} ont été avancées (Stathopoulos et Hellums, 1985). Cette valeur-seuil est du même ordre que les valeurs de contraintes mécaniques normales calculées dans ce travail, mais il ne faut cependant pas en tirer de conclusions trop rapides. En effet, la valeur-seuil a été déterminée dans un écoulement « modèle », non représentatif de l'écoulement dans une cuve agitée. Il faut également tenir compte du fait que, d'une part, la sensibilité cellulaire vis-à-vis des contraintes dépend du type de cellule et que, d'autre part, des contraintes mécaniques inférieures à celles nécessaire au décrochement de la cellule peuvent quand même avoir un effet sur son métabolisme (Godoy, 2008) et donc potentiellement sur la productivité globale du procédé biotechnologique.

Les études menées pour déterminer la sensibilité cellulaire aux contraintes mécaniques ne se sont pas limitées à celles réalisées dans des dispositifs « modèles ». De nombreuses équipes ont tenté d'évaluer cette sensibilité directement dans des cuves agitées (Cherry et Papoutsakis, 1989 ; Croughan *et al.*, 1988, 1989, 2006). Des cultures de cellules animales ont été réalisées à différentes vitesses d'agitation. L'impact de la vitesse sur la croissance des cellules, sur l'expression de certaines molécules... a été étudié. Cependant, la grande majorité de ces études a conduit à l'élaboration de modèles de cinétique de croissance et de mort basés sur

des grandeurs globales de l'écoulement telles que la puissance globale dissipée. Peu d'entre eux se sont basés sur des valeurs locales obtenues par CFD ou par mesures expérimentales. Parmi les quelques exceptions, citons par exemple, les travaux intéressants d'Elias *et al.* (1995) et ceux d'Olmos *et al.* (2009). Malheureusement, ces études ont été réalisées sur des cultures de cellules libres en suspension et les résultats ne sont donc pas extrapolables aux cultures de cellules fixées sur des microporteurs.

Sur base de cette discussion, il apparaît donc extrêmement difficile de découper la cuve en deux zones (« problématique » et « non problématique » pour le développement cellulaire) sur base d'une valeur seuil relative à la contrainte moyenne normale τ_N .

Le découpage de la cuve doit donc être basé sur une autre grandeur. Cette grandeur pourrait être l'échelle de Kolmogorov. Certains auteurs (Cherry et Papoutsakis, 1986, 1989 ; Croughan *et al.*, 1989, 2006) considèrent en effet qu'une cellule animale à la surface d'un microporteur ne peut être endommagée que s'il existe au sein de l'écoulement des tourbillons dont la taille est égale ou inférieure à la taille des microporteurs (voir Chapitres I et II). Ces petits tourbillons génèrent des contraintes de cisaillement à la surface des cellules. Ils favorisent également la collision entre microporteurs voisins car leur taille correspond à la distance moyenne entre deux microporteurs (Cherry et Papoutsakis (1986, 1989)). Pour calculer, en chaque point du plan de mesure la taille des plus petits tourbillons, nous avons estimé l'échelle de Kolmogorov à partir du taux de dissipation de l'énergie cinétique turbulente par la relation :

$$\lambda_K = \left(\frac{v^3}{\varepsilon} \right)^{1/4} \quad (III-27)$$

L'échelle de Kolmogorov est ensuite normée par la taille moyenne des microporteurs. Cette taille moyenne vaut 250 μm et a été déterminée par analyse d'image.

Les Figures III-59 à III-62 montrent la répartition spatiale de l'échelle de Kolmogorov normée par la taille moyenne des microporteurs générée par le mobile TTP 125 et EE 150 respectivement à la vitesse de rotation N_{js} et $2 N_{js}$. L'échelle de couleur a été adaptée pour faire ressortir les zones potentiellement problématiques pour le développement cellulaire. Il s'agit des zones jaunes, orange et rouges. Les zones blanches sont les zones non problématiques. Trois critères ont été successivement adoptés :

- Image de gauche : Les zones problématiques sont celles où le *ratio* entre l'échelle de Kolmogorov et la taille des microporteurs est inférieur à 1 ;
- Image du milieu : Les zones problématiques sont celles où le *ratio* entre l'échelle de Kolmogorov et la taille des microporteurs est inférieur à $\frac{2}{3}$;
- Image de droite : Les zones problématiques sont celles où le *ratio* entre l'échelle de Kolmogorov et la taille des microporteurs est inférieur à $\frac{1}{2}$.

Ces trois valeurs sont celles les plus fréquemment citées dans les études qui ont tenté de déterminer les conditions hydrodynamiques dans lesquelles les cellules animales sur microporteurs sont endommagées dans des cuves agitées.

À la vitesse de rotation N_{js} , les Figures III-59 et III-61 indiquent, pour les deux mobiles, la zone problématique :

- Est cantonnée à la zone balayée par le mobile et à une faible fraction du jet lorsque le critère choisi est λ_K / d_p égale à $1/2$;
- Est limitée à la zone balayée par le mobile et au jet à la sortie des pales lorsque le critère choisi est λ_K / d_p égale à $2/3$;
- Correspond à une zone répandue qui couvre une majorité de l'écoulement lorsque le critère choisi est λ_K / d_p égale à 1.

Le pourcentage en volume couvert par ces zones est indiqué dans le Tableau III-6.

A la vitesse de rotation $2 N_{js}$, les zones problématiques s'étendent fortement pour les deux mobiles et pour tous les critères sélectionnés.

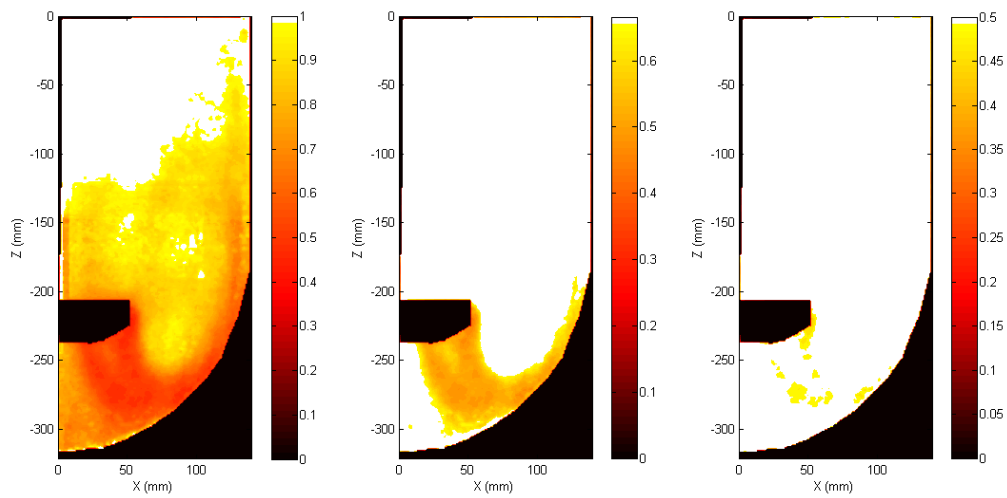


Figure III-59 : Mobile TTP 125 : Mise en évidence des zones où le ratio entre l'échelle de Kolmogorov locale et la taille moyenne des microporteurs (250 μm) est : (gauche) inférieur à 1, (milieu) inférieur à $2/3$, (droite) inférieur à $1/2$ lorsque le mobile tourne à la vitesse de rotation N_{js} .

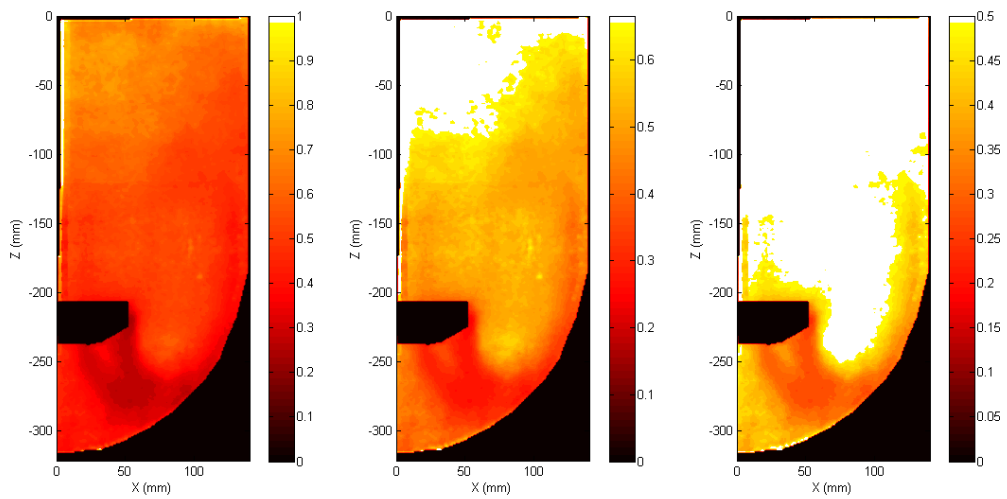


Figure III-60 : Mobile TTP 125 : Mise en évidence des zones où le ratio entre l'échelle de Kolmogorov locale et la taille moyenne des microporteurs (250 μm) est : (gauche) inférieur à 1, (milieu) inférieur à $2/3$, (droite) inférieur à $1/2$ lorsque le mobile tourne à la vitesse de rotation $2 N_{js}$.

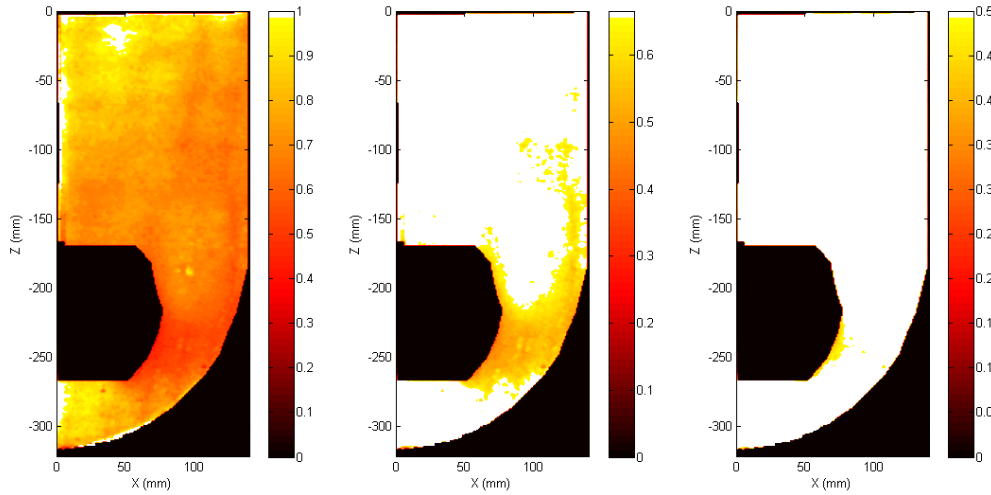


Figure III-61 : Mobile EE 150 : Mise en évidence des zones où le ratio entre l'échelle de Kolmogorov locale et la taille moyenne des microporteurs ($250 \mu\text{m}$) est : (gauche) inférieur à 1, (milieu) inférieur à $2/3$, (droite) inférieur à $1/2$ lorsque le mobile tourne à la vitesse de rotation N_{js} .

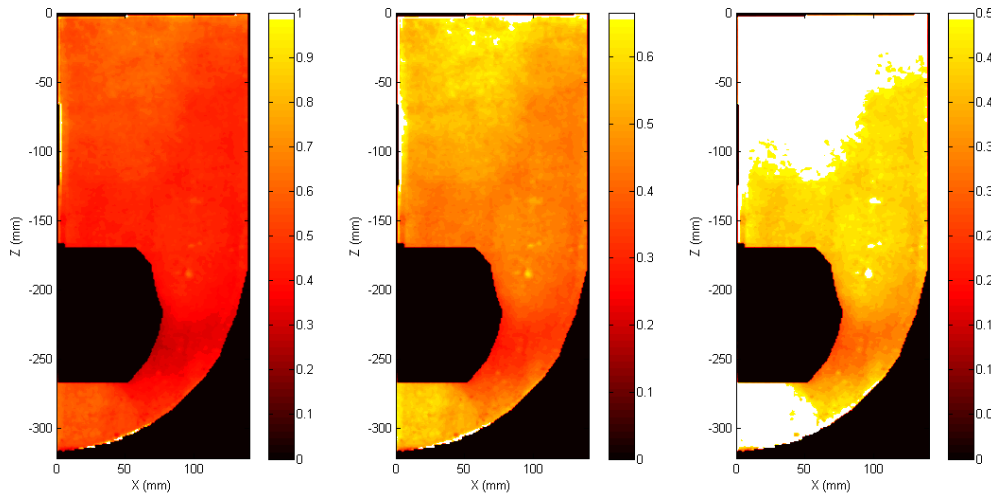


Figure III-62 : Mobile EE 150 : Mise en évidence des zones où le ratio entre l'échelle de Kolmogorov locale et la taille moyenne des microporteurs ($250 \mu\text{m}$) est : (gauche) inférieur à 1, (milieu) inférieur à $2/3$, (droite) inférieur à $1/2$ lorsque le mobile tourne à la vitesse de rotation $2 N_{js}$.

Tableau III-6 : Pourcentage en volume couvert par les zones problématiques en fonction du critère sélectionné et de la vitesse de rotation du mobile.

TTP 125	N_{js}	$2 N_{js}$	EE 150	N_{js}	$2 N_{js}$
1 ^{er} critère ($\lambda_K / d_p = 1$)	76.2 %	100 %	1 ^{er} critère ($\lambda_K / d_p = 1$)	100 %	100 %
2 ^{ème} critère ($\lambda_K / d_p = 0.66$)	19.3 %	88.4 %	2 ^{ème} critère ($\lambda_K / d_p = 0.66$)	39.2 %	100 %
3 ^{ème} critère ($\lambda_K / d_p = 0.5$)	3.2 %	38.1 %	3 ^{ème} critère ($\lambda_K / d_p = 0.5$)	9.5 %	70.2 %

Les distributions du *ratio* entre l'échelle de Kolmogorov et la taille des microporteurs montrent donc que, pour les valeurs les plus sévères du critère, des zones problématiques existent déjà à la vitesse de rotation N_{js} . Ce constat, basé sur l'analyse de la distribution des

valeurs locales de l'échelle de Kolmogorov λ_K , confirme les résultats obtenus au chapitre précédent, où une valeur moyenne de ε avait été estimée de manière globale, à partir de la puissance globale dissipée au sein de la cuve.

Les différentes découpes de la cuve en zones potentiellement problématiques et en zones non problématiques seront couplées au Chapitre VI aux trajectoires de la particule obtenues au Chapitre V afin d'accéder à l'histoire de la particule en termes de temps de séjour, de temps de retour et de fréquence de retour dans la zone « problématique ».

7 Conclusion

7.1 Synthèse

L'étude présentée dans ce chapitre correspond à la première étape de la méthodologie développée dans cette thèse. Il s'agit de la caractérisation de manière eulérienne de l'écoulement turbulent en établissant, à partir de mesures 3D P.I.V. traitées selon l'approche de Reynolds, des cartes décrivant de manière quantitative la répartition spatiale de :

- La composante moyenne de l'écoulement ;
- La composante turbulente *via* ses deux grandeurs caractéristiques que sont l'énergie cinétique turbulente k et son taux de dissipation ε ;
- Les contraintes mécaniques générées par l'écoulement *via* les composantes du tenseur de Reynolds ($\tau_{ij} = \rho_l \overline{u'_i u'_j}$).

La connaissance de ces cartes permet de diviser le volume de la cuve en deux régions : l'une est labélisée comme « problématique pour le développement cellulaire » car les caractéristiques de l'écoulement local sont inadaptées à des cellules animales cultivées sur microporteurs tandis que l'autre est labélisée comme non « non problématique ».

L'analyse des champs moyens générés par les mobiles TTP 125 et EE 150 à leur vitesse de rotation N_{js} montre que les mobiles génèrent tous les deux un écoulement axial composé d'un jet et de deux boucles de recirculation et que, leurs composantes comprises dans le plan vertical de mesure sont d'amplitudes similaires. Par contre, il apparaît que la composante tangentielle générée par le mobile EE 150 est deux fois plus importante que celle produite par le mobile TTP 125. La comparaison des champs moyens dans les différents plans de mesure montre que l'écoulement mixte axio-tangentielle généré par mobile EE 150 est significativement déformé à la proximité des contre-pales, tandis que l'écoulement majoritairement axial généré par le mobile TTP 125 présente une symétrie de révolution quasi parfaite.

L'analyse des champs d'énergie cinétique turbulente et de son taux de dissipation générés par les mobiles TTP 125 et EE 150 met en évidence que les mobiles génèrent des distributions spatiales similaires à leur vitesse de rotation N_{js} (ou à des multiples de celles-ci). Ces distributions sont caractérisées par des valeurs maximales ($k_{max} \cong 2.5 \times 10^{-3} \text{ m}^2 \text{ s}^{-2}$, $\varepsilon_{max} \cong 5 \times 10^{-3} \text{ m}^2 \text{ s}^{-3}$) dans la zone balayée par le mobile, dans le jet à la sortie de ses pales et dans la partie ascendante de la boucle de recirculation. Les valeurs de k et de ε sont beaucoup plus

faibles dans le reste de l'écoulement ($k < 1 \times 10^{-3} \text{ m}^2 \text{ s}^{-2}$; $\varepsilon < 1 \times 10^{-3} \text{ m}^2 \text{ s}^{-3}$). Les résultats obtenus sont en bon accord avec les résultats de la littérature ainsi qu'avec des résultats déduits de grandeurs globales mesurées comme la puissance globale dissipée. Bien que conduisant à des distributions spatiales de k et de ε très similaires à N_{js} , les mobiles ont des caractéristiques intrinsèques très différentes comme le montre l'analyse des champs de k et ε rendus adimensionnels en les divisant respectivement par $(\pi N d)^2$ et $N^3 d^2$. Ces champs adimensionnels présentent en effet des distributions numériques caractérisées par des gammes de valeurs très distinctes. Par exemple, les valeurs maximales normées de k et ε valent respectivement $0.075 \pi^2 N^2 d^2$ et $5 N^3 d^2$ pour le mobile EE 150 alors qu'elles ne valent que $0.025 \pi^2 N^2 d^2$ et $0.6 N^3 d^2$ pour le mobile TTP 125.

L'analyse de la distribution spatiale des composantes du tenseur de contraintes de Reynolds montre que les contraintes mécaniques sont maximales dans le jet à la sortie des pales ($\tau_{ii,\max} \cong 1.5 - 2 \text{ N m}^{-2}$, $\tau_{ij,\max} \cong 0.2 \text{ N m}^{-2}$) et nettement plus faibles ailleurs ($\tau_{ii,\max} < 0.8 \text{ N m}^{-2}$, $\tau_{ij,\max} < 0.1 \text{ N m}^{-2}$). Il apparaît également que les contraintes normales sont quasiment dix fois plus élevées que les contraintes de cisaillement. Les premières jouent donc un rôle prépondérant. La moyenne des contraintes normales τ_N a été calculée afin d'obtenir une seule carte qui caractérise la répartition spatiale des contraintes mécaniques.

Le découpage de la cuve en zone problématique ou non pour le développement cellulaire a été basé sur la répartition spatiale de l'échelle de Kolmogorov λ_K et non sur la répartition spatiale de τ_N car d'une part, il a été impossible de trouver dans la littérature une valeur seuil de τ_N pertinente dans le cas où les cellules sont cultivées sur microporteurs dans une cuve agitée et d'autre part, diverses études ont mis en évidence que le rapport entre l'échelle de Kolmogorov et la taille des microporteurs est un bon indicateur de l'impact potentiel du stress hydrodynamique sur le développement cellulaire. Trois *ratios*, fréquemment cités dans la littérature, ont été sélectionnés : un *ratio* de 1, un *ratio* de $\frac{2}{3}$ et un *ratio* de $\frac{1}{2}$. Le découpage de la cuve selon ces trois critères montre que plus le critère est strict (le plus strict étant le *ratio* de 1) plus la zone problématique est étendue. Il en est de même lorsque la vitesse de rotation du mobile augmente. Ainsi, à la vitesse de rotation N_{js} , la zone problématique correspond à une zone couvrant les $\frac{3}{4}$ inférieur de la cuve lorsque le *ratio* choisi vaut 1 tandis que la zone problématique est cantonnée à la zone balayée par le mobile et une faible fraction du jet lorsque le *ratio* choisi est $\frac{1}{2}$. A la vitesse de rotation $2 N_{js}$, elle correspond, par contre, à l'ensemble de la cuve si le *ratio* choisi est 1 et à une zone couvrant la zone balayée par le mobile, le jet à la sortie des pales et une partie de la boucle de recirculation supérieure lorsque le *ratio* vaut $\frac{1}{2}$.

7.2 Discussions

Quelle que soit la grandeur qui a été étudiée dans ce chapitre, une répartition spatiale non homogène a été observée. Dans tous les cas, des valeurs nettement plus élevées ont été obtenues dans la zone balayée par le mobile et dans le jet, à la sortie des pales du mobile. Du

fait de cette inhomogénéité, une cellule fixée sur un microporteur en mouvement dans l'écoulement sera soumise à un environnement hydrodynamique local très variable au cours du temps suivant ses positions successives au sein de la cuve. La caractérisation eulérienne de l'écoulement ne permet donc pas, à elle seule, d'accéder à cette succession d'environnements et d'évaluer leur possible effet intégratif sur le métabolisme cellulaire. Pour caractériser la succession d'environnements, il est nécessaire de coupler l'approche eulérienne présentée dans ce chapitre à une approche lagrangienne. Cette approche lagrangienne, présentée au Chapitre V, consiste à déterminer la trajectoire d'une particule grâce à un dispositif expérimentale de trajectographie optique. Le couplage des deux approches est présenté au Chapitre VI.

Annexe III-1 : Validation des mesures 3D P.I.V. : résultats relatifs au mobile EE 150

Au Point 2.2, les mesures 3D P.I.V ont été validées par comparaison à des mesures 2D P.I.V.. Afin de conserver un texte le plus concis possible, seuls les résultats relatifs au mobile TTP 125 ont été présentés. Les résultats relatifs au mobile EE 150 sont donc présentés dans cette annexe. Comme annoncé précédemment, les mêmes conclusions peuvent être tirées : les mesures 3D P.I.V. permettent d'accéder de manière fiable aux champs moyens ($\overline{u_x}$, Figure III-63) et ($\overline{u_y}$, Figure III-64) ainsi qu'à la répartition spatiale des moyennes quadratiques des fluctuations des composantes de la vitesse comprises dans le plan de mesure ($\sqrt{\overline{u_x'^2}}$, $\sqrt{\overline{u_z'^2}}$, $\overline{u'_x u'_z}$, Figure III-65, Figure III-66, Figure III-67). Cependant, pour ce mobile, il n'a pas été possible de valider les composantes hors plan en raison de l'absence de mesure 2D P.I.V. dans des plans horizontaux ou tangentiels. Néanmoins, puisque la même calibration des caméras a été employée pour les deux mobiles, il y a de fortes raisons de penser que la moyenne quadratique de la composante tangentielle de la fluctuation de la vitesse $\sqrt{\overline{u_z'^2}}$ estimée par 3D P.I.V. est peu fiable et qu'il convient de l'évaluer à l'aide de l'hypothèse d'« isotropie » de la Relation III-3.

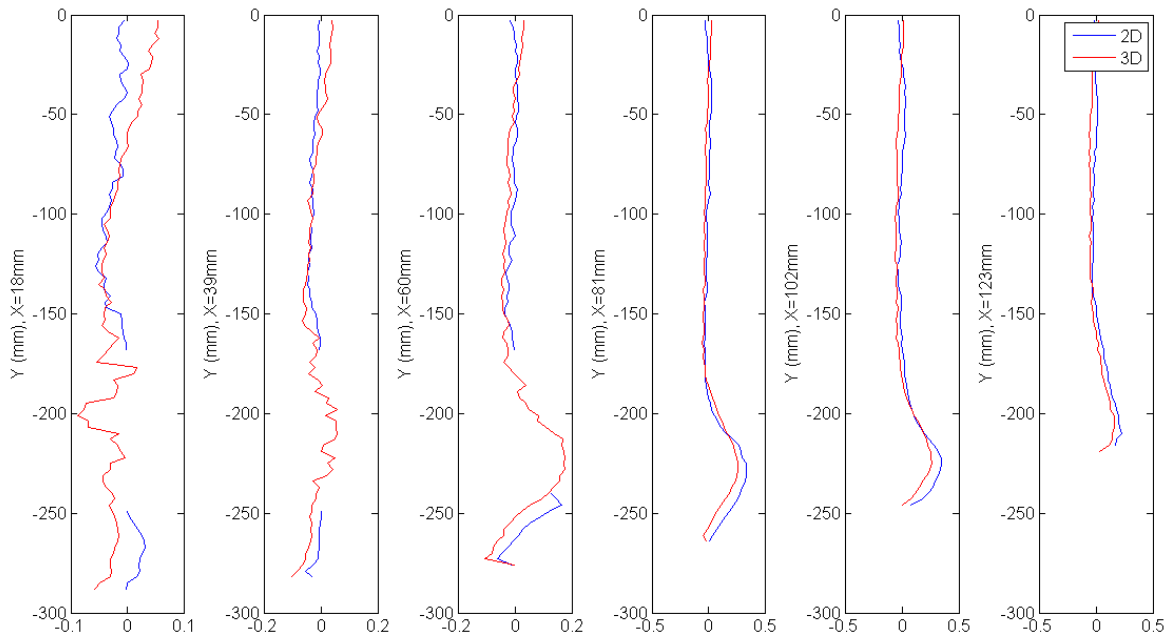


Figure III-63 : Comparaison des profils axiaux de la composante radiale adimensionnelle $\overline{u_x} / \pi N d$ de la vitesse moyenne : mobile EE 150, mesures 2D P.I.V. (bleu) et 3D P.I.V. (rouge) dans le plan vertical.

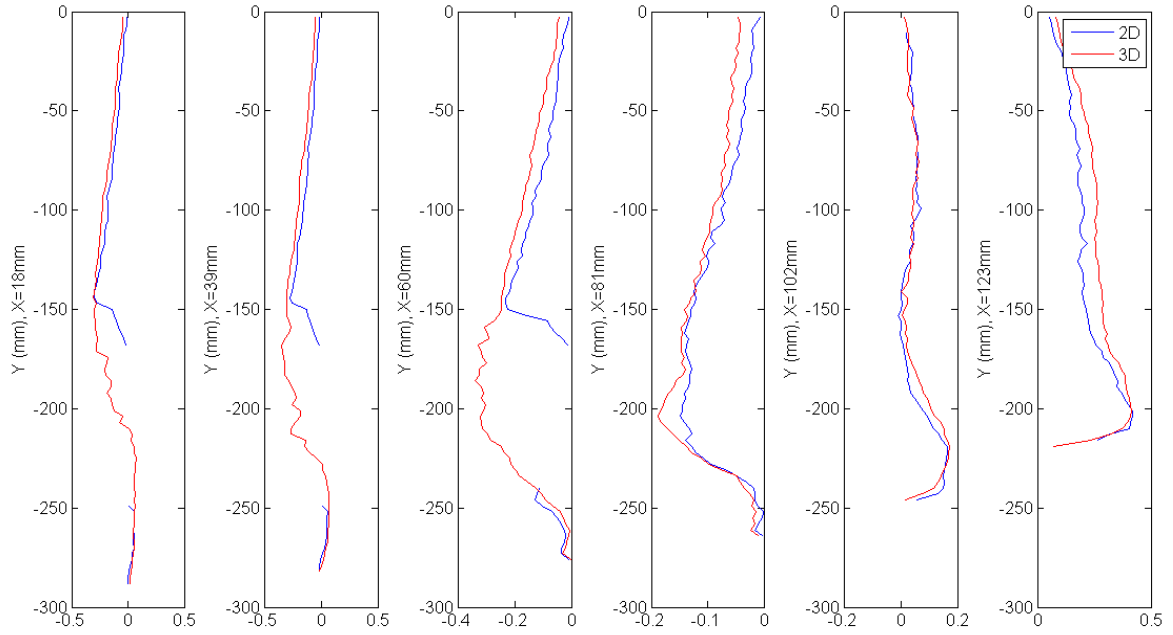


Figure III-64 : Comparaison des profils axiaux de la composante axiale adimensionnelle $\overline{u_y} / \pi N d$ de la vitesse moyenne : mobile EE 150, mesures 2D P.I.V. (bleu) et 3D P.I.V. (rouge) dans le plan vertical.

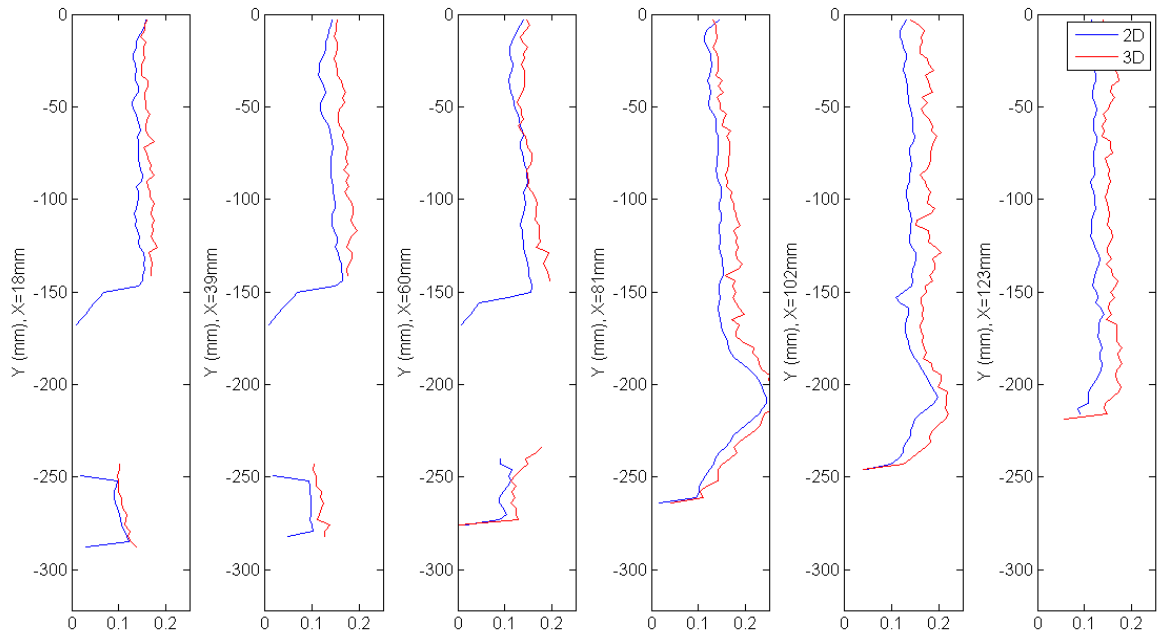


Figure III-65 : Comparaison des profils axiaux de la composante radiale adimensionnelle $\sqrt{u_x'^2} / \pi N d$ de la moyenne quadratique de fluctuation de vitesse : mobile EE 150, mesures 2D P.I.V. (bleu) et 3D P.I.V. (rouge) dans le plan vertical.

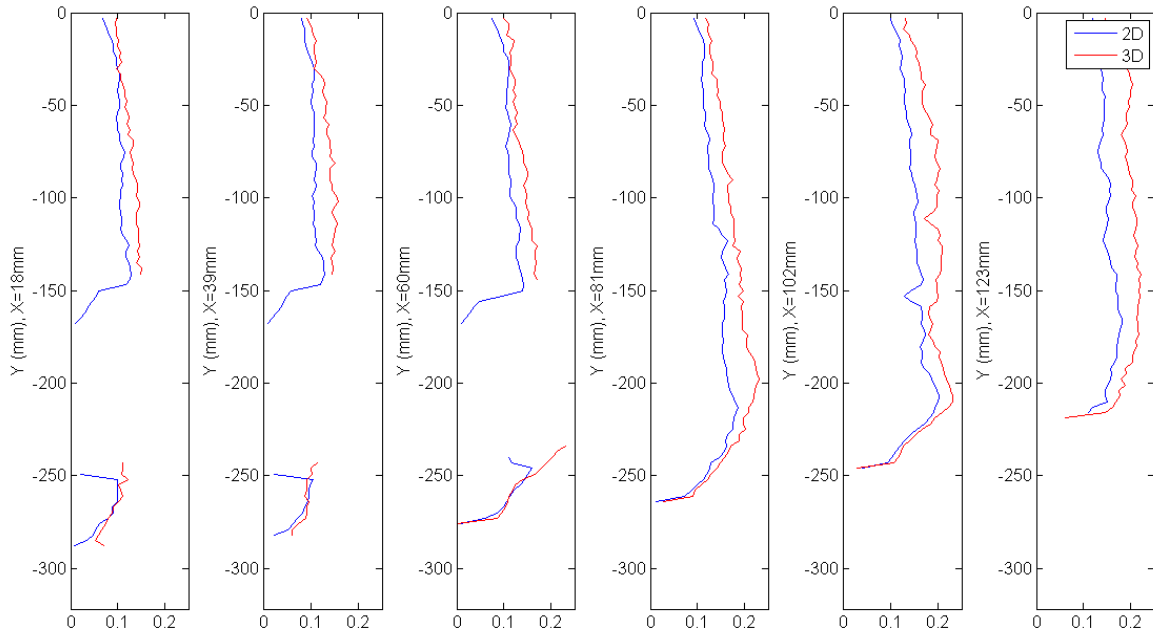


Figure III-66 : Comparaison des profils axiaux de la composante axiale adimensionnelle $\sqrt{u_y'^2} / \pi N d$ de la moyenne quadratique de fluctuation de vitesse : mobile EE 150, mesures 2D P.I.V. (bleu) et 3D P.I.V. (rouge) dans le plan vertical.

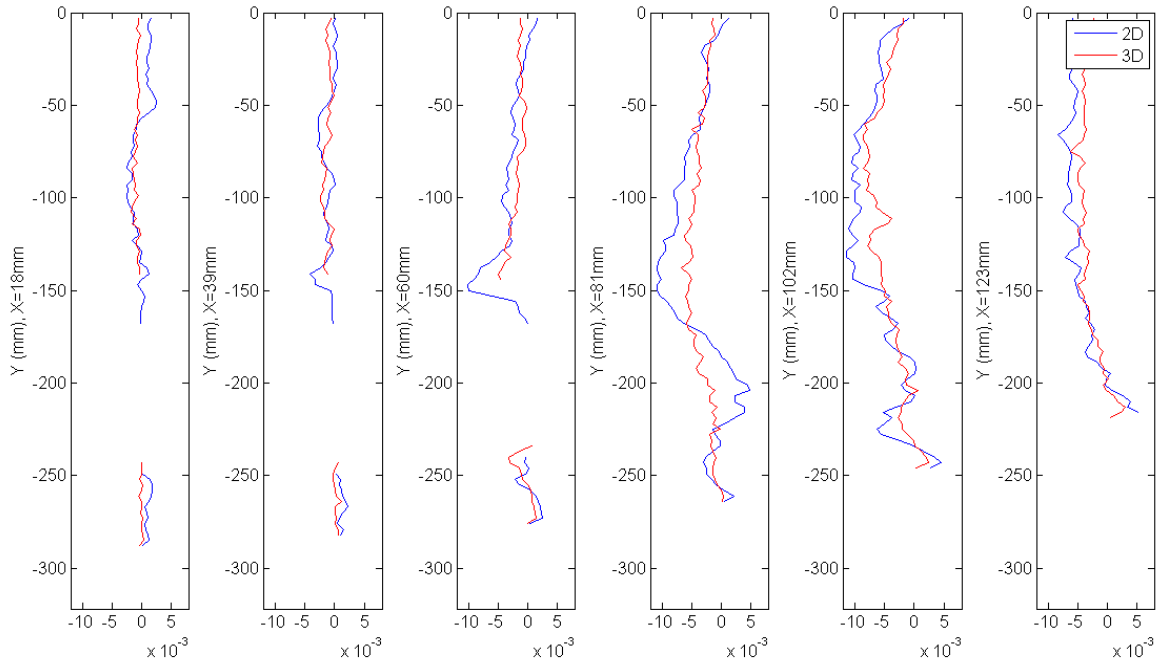


Figure III-67 : Comparaison des profils axiaux de la moyenne temporelle du produit croisé des composantes radiale et axiale de la fluctuation de la vitesse $\overline{u_x' u_y'} / (\pi N d)^2$: mobile EE 150, mesures 2D P.I.V. (bleu) et 3D P.I.V. (rouge) dans le plan vertical.

Liste des symboles

EE 150	Mobile axial de modèle « Elephant Ear » (Applikon) diamètre d=150 mm	
TTP 125	Mobile axial de modèle TTP (Mixel) et de diamètre d=125 mm	
2D P.I.V.	P.I.V. mesurant 2 des 3 composantes du vecteur de vitesse	
3D P.I.V.	P.I.V. stéréoscopique mesurant les 3 composantes du vecteur de vitesse	
C	Hauteur du mobile dans la cuve	[m]
C_s	Constante de Smagorinski	
d	Diamètre du mobile	[m]
d_p	Diamètre moyen des microporteurs	[m]
k	Energie cinétique turbulente	[J]
k_{max}	Estimation de la valeur maximale de l'énergie cinétique turbulente	[J]
k_{moyen}	Moyenne de l'énergie cinétique turbulente	[J]
N	Vitesse de rotation	[tour s ⁻¹]
N_{js}	Vitesse de rotation minimale de maintien en suspension	[tour s ⁻¹]
P	Puissance globale dissipée	[W]
p	Pression hydrostatique	[N m ⁻²]
$P_{25,50,75,90,99}$	Percentile des distributions numériques	
R_{ii}	Fonction d'auto corrélation des champs fluctuants de vitesse	[-]
T	Diamètre de la cuve	[m]
t	Temps	[s]
u	Vitesse instantanée	[m s ⁻¹]
\bar{u}	Vitesse moyenne temporelle	[m s ⁻¹]
u'	Fluctuation de la vitesse	[m s ⁻¹]
$\sqrt{\overline{u'^2}}$	Moyenne quadratique de la fluctuation de la vitesse	[m s ⁻¹]
$\overline{u'_i u'_j}$	Moyenne temporelle du produit croisé des composantes de la fluctuation de la vitesse	[m ² s ⁻²]
u_x	Composante radiale du vecteur de vitesse	[m s ⁻¹]
u_y	Composante axiale du vecteur de vitesse	[m s ⁻¹]
u_z	Composante tangentielle du vecteur de vitesse	[m s ⁻¹]
V_{swept}	Volume balayé par le mobile	[m ³]
V_{tip}	Vitesse linéaire en bout de pale ($\Pi.N.d$)	[m s ⁻¹]
W	Hauteur des pales	[m]
x	Coordonnée radiale comprise dans le plan du laser	[m]
y	Coordonnée axiale comprise dans le plan du laser	[m]
z	Coordonnée tangentielle perpendiculaire au plan du laser	[m]
$\vec{x}, \vec{y}, \vec{z}$	Axes du repère spatial associé aux mesures 3D P.I.V.	[-]
α	Angle entre la projection du vecteur 3D et l'horizontale	[°]
β	Angle formé entre le vecteur 3D et le plan de mesure	[°]
Δ	Résolution spatiale des mesures P.I.V.	[m]
Δt	Intervalle de temps	[s]
ε	Taux de dissipation de l'énergie cinétique turbulente	[m ² s ⁻³]

\mathcal{E}_{\max}	Estimation de la valeur maximale du taux de dissipation de l'énergie cinétique turbulente	$[\text{m}^2 \text{s}^{-3}]$
$\mathcal{E}_{\text{moyen}}$	Moyenne du taux de dissipation de l'énergie cinétique turbulente	$[\text{m}^2 \text{s}^{-3}]$
λ_K	Échelle de Kolmogorov	$[\text{m}]$
λ_{Taylor}	Échelle de Taylor	$[\text{m}]$
Λ	Échelle intégrale	$[\text{m}]$
$\Lambda_{x,y,z}$	Échelle intégrale dans la direction x, y ou z	$[\text{m}]$
μ	Viscosité dynamique	$[\text{Pa}]$
ν	Viscosité cinématique	$[\text{m}^2 \text{s}^{-1}]$
ν_t	Viscosité turbulente	$[\text{m}^2 \text{s}^{-1}]$
ρ_l	Masse volumique de l'eau	$[\text{kg m}^{-3}]$
ρ_p	Masse volumique des particules de traceur 3D P.I.V.	$[\text{kg m}^{-3}]$
τ_{ii}	Contraintes normales	$[\text{N m}^{-2}]$
τ_{ij}	Contraintes de cisaillement	$[\text{N m}^{-2}]$
τ_N	Moyenne des contraintes normales	$[\text{N m}^{-2}]$

Table des figures

<i>Figure III-1 : Choix de l'orientation des axes et des composantes de la vitesse par rapport à la position du plan éclairé par le laser (représenté par le cadre vert ci-dessus).....</i>	<i>109</i>
<i>Figure III-2 : Reconstruction du vecteur 3D à partir de ces deux projections dans le plan éclairé par le laser et mesuré par chaque caméra.</i>	<i>109</i>
<i>Figure III-3 : Mires de calibration utilisées lors des mesures 3D P.I.V.....</i>	<i>110</i>
<i>Figure III-4 : Montures de Scheimpflug.....</i>	<i>111</i>
<i>Figure III-5: Boitier de synchronisation et station de calcul Dell.....</i>	<i>111</i>
<i>Figure III-6 : Zones observées successivement par les deux caméras.....</i>	<i>111</i>
<i>Figure III-7 : Illustration de l'algorithme de traitement de la corrélation croisée adaptative</i>	<i>112</i>
<i>Figure III-8 : Position des contre-pales vis-à-vis du plan de mesure.</i>	<i>112</i>
<i>Figure III-9 : Ensemble des traitements appliqués sur les mesures 3D P.I.V.</i>	<i>113</i>
<i>Figure III-10 : Position du plan de mesure horizontal x-z (Delafosse et al., 2011)</i>	<i>114</i>
<i>Figure III-11 : Position du plan de mesure tangentiel y-z (Delafosse et al., 2011).....</i>	<i>114</i>
<i>Figure III-12 : Comparaison des profils axiaux de la composante radiale adimensionnelle $\overline{u_x}/\pi N d$ de la vitesse moyenne : mobile TTP 125, mesures 2D P.I.V. (bleu) et 3D P.I.V. (rouge) dans le plan vertical.</i>	<i>116</i>
<i>Figure III-13 : Comparaison des profils axiaux de la composante axiale adimensionnelle $\overline{u_y}/\pi N d$ de la vitesse moyenne : mobile TTP 125, mesures 2D P.I.V. (bleu) et 3D P.I.V. (rouge) dans le plan vertical.</i>	<i>116</i>
<i>Figure III-14 : Comparaison des profils radiaux de la composante radiale adimensionnelle $\overline{u_x}/\pi N d$ de la vitesse moyenne : mobile TTP 125, mesures 2D P.I.V. (bleu) dans le plan horizontal (y=-220 mm) et 3D P.I.V. (rouge) dans le plan vertical.....</i>	<i>116</i>
<i>Figure III-15 : Comparaison des profils radiaux de la composante tangentielle adimensionnelle $\overline{u_z}/\pi N d$ de la vitesse moyenne : mobile TTP 125, mesures 2D P.I.V. (bleu) dans le plan horizontal (y=-220 mm) et 3D P.I.V. (rouge) dans le plan vertical.</i>	<i>116</i>

Figure III-16 : Comparaison des profils axiaux de la composante axiale adimensionnelle $\overline{u_y}/\pi N d$ de la vitesse moyenne : mobile TTP 125, mesures 2D P.I.V. (bleu) dans le plan tangentiel ($r=62.5$ mm) et 3D P.I.V. (rouge) dans le plan vertical.	117
Figure III-17 : Comparaison des profils radiaux de la composante tangentielle adimensionnelle $\overline{u_z}/\pi N d$ de la vitesse moyenne : mobile TTP 125, mesures 2D P.I.V. (bleu) dans le plan tangentiel ($r=62.5$ mm) 3D P.I.V. (rouge) dans le plan vertical.....	117
Figure III-18 : Comparaison des profils axiaux de la composante radiale adimensionnelle $\sqrt{\overline{u_x'^2}}/\pi N d$ de la moyenne quadratique de fluctuation de vitesse : mobile TTP 125, mesures 2D P.I.V. (bleu) et 3D P.I.V. (rouge) dans le plan vertical.	117
Figure III-19 : Comparaison des profils axiaux de la composante axiale adimensionnelle $\sqrt{\overline{u_y'^2}}/\pi N d$ de la moyenne quadratique de fluctuation de vitesse : mobile TTP 125, mesures 2D P.I.V. (bleu) et 3D P.I.V. (rouge) dans le plan vertical.	118
Figure III-20 : Comparaison des profils axiaux de la moyenne temporelle du produit croisé des composantes radiale et axiale de fluctuation de la vitesse $\overline{u'_x u'_y}/(\pi N d)^2$: mobile TTP 125, mesures 2D P.I.V. (bleu) et 3D P.I.V. (rouge) dans le plan vertical.	118
Figure III-21 : Comparaison des profils radiaux de la composante radiale adimensionnelle $\sqrt{\overline{u_y'^2}}/\pi N d$ de la moyenne quadratique de fluctuation de vitesse : mobile TTP 125, mesures 2D P.I.V. (bleu) dans le plan horizontal ($y=-220$ mm), 3D P.I.V. (rouge) dans le plan vertical, Relation d'isotropie III-3 (noir) dans le plan vertical.	120
Figure III-22 : Comparaison des profils radiaux de la moyenne temporelle du produit croisé des composantes radiale et tangentielle de la fluctuation de la vitesse $\overline{u'_x u'_z}/(\pi N d)^2$: mobile TTP 125, mesures 2D P.I.V. (bleu) dans le plan horizontal et 3D P.I.V. (rouge) dans le plan vertical.	120
Figure III-23 : Comparaison des profils axiaux de la composante axiale adimensionnelle $\sqrt{\overline{u_x'^2}}/\pi N d$ de la moyenne quadratique de fluctuation de vitesse : mobile TTP 125, mesures 2D P.I.V. (bleu) dans le plan tangentiel ($x=67.5$ mm), 3D P.I.V. (rouge) dans le plan vertical, Relation d'isotropie III-3 (noir) dans le plan vertical.	120
Figure III-24 : Comparaison des profils axiaux de la moyenne temporelle du produit croisé des composantes axiale et tangentielle de la fluctuation de la vitesse $\overline{u'_y u'_z}/(\pi N d)^2$: mobile TTP 125, mesures 2D P.I.V. (bleu) dans le plan tangentiel et 3D P.I.V. (rouge) dans le plan vertical.	120
Figure III-25 : Mobile TTP 125.....	122

Figure III-26 : Mobile EE 150	123
Figure III-27 : Outils de comparaison de l'intensité relative de la composante axiale vis-à-vis de la composante radiale (α) et de la composante tangentielle vis-à-vis de celles comprises dans le plan (β).	124
Figure III-28 : Mobile TTP 125, (gauche) comparaison de l'importance relative de la composante axiale par rapport à la composante radiale (α) (droite) et de la composante tangentielle par rapport à la projection dans le plan du laser (β) : bleu $<30^\circ$, jaune : $[30^\circ-60^\circ]$ et rouge $> 60^\circ$	125
Figure III-29 : Mobile EE 150, (gauche) comparaison de l'importance relative de la composante axiale par rapport à la composante radiale (α) (droite) et de la composante tangentielle par rapport à la projection dans le plan du laser (β) : bleu $<30^\circ$, jaune : $[30^\circ-60^\circ]$ et rouge $> 60^\circ$	125
Figure III-30 : Illustration de la boucle de recirculation d'axe vertical qui se forme à l'arrière des contre-pales.	127
Figure III-31 : EE 150 : Champ moyen de vitesse obtenu à 20 rpm (N_{js}) dans les 5 plans de mesure verticaux. La couleur du fond indique la valeur de la norme des vecteurs de vitesse 3D en chaque point tandis que leurs projections dans le plan du laser sont représentées par les flèches noires.....	128
Figure III-32 : Comparaison des composantes radiale, axiale et tangentielle mesurées dans le plan formant un angle de 9° et 45° avec le plan des contre-pales, Mobile EE 150, $N=20$ rpm.	129
Figure III-33 : Comparaison des profils axiaux de la norme de la vitesse dans le plan formant un angle de 45° avec le plan des contre-pales (bleu) et la moyenne des 5 plans (rouge), Mobile EE 150, $N=20$ rpm.	129
Figure III-34 : TTP 125 : Champ moyen de vitesse obtenu à 50 rpm (N_{js}) dans les 5 plans de mesure verticaux. La couleur du fond indique la valeur de la norme du vecteur de vitesse 3D en chaque point tandis que leurs projections dans le plan du laser sont représentées par les flèches noires.	130
Figure III-35 : Comparaison des composantes radiale, axiale et tangentielle mesurées dans le plan formant un angle de 9° et 45° avec le plan des contre-pales, Mobile TTP 125, $N=50$ rpm.	131
Figure III-36 : Comparaison des profils axiaux de la norme de la vitesse dans le plan formant un angle de 45° avec le plan des contre-pales (bleu) et la moyenne des 5 plans (rouge), Mobile TTP 125, $N=50$ rpm.	131

Figure III-37 : Etude de la convergence de l'énergie cinétique turbulente en fonction du nombre de champs fluctuants utilisé pour la calculer.	133
Figure III-38 : Spectre de l'énergie cinétique turbulente et de son taux de dissipation (Bailly et Marsden, 2011) L'abscisse est exprimée en nombre d'onde κ	133
Figure III-39 : Distribution du ratio entre la résolution des mesures 3D P.I.V. et l'échelle de Taylor estimée à partir de la moyenne quadratique de la composante radiale (gauche) ou axiale (droite) de la fluctuation de la vitesse à la vitesse de rotation N_{js} . Cadre de gauche : mobile TTP 125, cadre de droite mobile EE 150.....	134
Figure III-40 : Distribution du ratio entre la résolution des mesures 3D P.I.V. et l'échelle de Taylor estimée à partir de la moyenne quadratique de la composante radiale (gauche) ou axiale (droite) de la fluctuation de la vitesse à la vitesse de rotation $2 N_{js}$. Cadre de gauche : mobile TTP 125, cadre de droite mobile EE 150.....	134
Figure III-41 : Mobile TTP 125 (rouge) : zone où k est maximale, (bleu) : zone où k est intermédiaire.....	135
Figure III-42 : Mobile TTP 125 : (gauche) : distribution de l'énergie cinétique turbulente ($m^2 s^{-2}$) à la vitesse de rotation N_{js} . (droite) : distribution adimensionnelle de l'énergie cinétique turbulente normée par le carré de la vitesse au bout de pale $\pi^2 N^2 d^2$	136
Figure III-43 : Mobile EE 150 : (gauche) : distribution de l'énergie cinétique turbulente ($m^2 s^{-2}$) à la vitesse de rotation N_{js} . (droite) : distribution adimensionnelle de l'énergie cinétique turbulente normée par le carré de la vitesse au bout de pale $\pi^2 N^2 d^2$	136
Figure III-44 : Mobile TTP 125 : Comparaison des profils axiaux de $k/\pi^2 N^2 d^2$ obtenus dans les différents plans verticaux avec les profils moyens (bleu foncé) obtenus en moyennant les résultats acquis dans les cinq plans.	137
Figure III-45 : Mobile EE 150 : Comparaison des profils axiaux de $k/\pi^2 N^2 d^2$ obtenus dans les différents plans verticaux avec les profils moyens (bleu foncé) obtenus en moyennant les résultats acquis dans les cinq plans.....	137
Figure III-46 : Illustration de l'ajustement d'une fonction exponentielle (♦) décroissante sur les points expérimentaux de la fonction d'auto-corrélation $R_{xx, droite}$ (▲) obtenue au point ($x=-0.05$ m, $y=0.04$ m).	142
Figure III-47 : Mobile TTP 125 : Répartition spatiale de l'échelle intégrale globale Λ obtenue à la vitesse de rotation N_{js} : à gauche, valeurs exprimées en m ; au milieu, valeurs normées par le diamètre du mobile ($d=125$ mm) ; à droite, valeurs normées par la hauteur de pale ($W=27$ mm).....	143

Figure III-48 : Mobile EE 150 : Répartition spatiale de l'échelle intégrale globale Λ obtenue à la vitesse de rotation N_{js} : à gauche, valeurs exprimées en m ; au milieu, valeurs normées par le diamètre du mobile ($d=125$ mm) ; à droite, valeurs normées par la hauteur de pale ($W=95$ mm).....	143
Figure III-49 : Profil radial de l'échelle intégrale (mm) obtenue à 5 mm sous le mobile A310 ($d/T=0.33$, $Y/T=0.33$), Bugay (1998).	144
Figure III-50 : Mobile TTP 125 : Répartition spatiale du taux de dissipation de l'énergie cinétique turbulente estimée par la méthode dimensionnelle (Relation III-15). (Gauche) : valeurs absolues ($m^2 s^{-3}$) calculées à la vitesse de rotation N_{js} (Droite) valeurs normées par $N^3 d^2$	145
Figure III-51 : EE 150 : Répartition spatiale du taux de dissipation de l'énergie cinétique turbulente estimée par la méthode dimensionnelle (Relation III-15). (Gauche) : valeurs absolues ($m^2 s^{-3}$) calculées à la vitesse de rotation N_{js} (Droite) valeurs normées par $N^3 d^2$..	145
Figure III-52 : Évolution du taux de dissipation de l'énergie cinétique turbulente en fonction de la résolution spatiale des mesures (gauche) Evolution du percentile 99 de la distribution obtenue pour le mobile TTP 125 à 50 rpm (droite) Evolution de la valeur moyenne dans le jet des pales d'un mobile de type hélice A310 (Lightnin, $d/T=0.33$, $Y/T=0.33$, $N=2165$ rpm, Baldi et al., 2002).....	148
Figure III-53 : Comparaison de la répartition du taux de dissipation de l'énergie cinétique turbulente ($m^2 s^{-3}$) observées dans ce travail et dans l'étude de Delafosse et al. (2011).....	148
Figure III-54 : Mobile TTP 125 : Comparaison des profils axiaux de $\varepsilon / N^3 d^2$ obtenus dans les différents plans verticaux avec les profils moyens (bleu foncé) obtenus en moyennant les résultats acquis dans les 5 plans.	149
Figure III-55 : Mobile EE 150 : Comparaison des profils axiaux de $\varepsilon / N^3 d^2$ obtenus dans différents plans verticaux avec les profils moyens (bleu foncé) obtenus en moyennant les résultats acquis dans les 5 plans.	149
Figure III-56 : Représentation de l'écoulement turbulent proposée par Venkat et al. (1998) : zones de pur cisaillement où sont générées des contraintes de cisaillement (deux figures de gauche) et zones de contraction ou de divergence qui entraînent des contraintes normales (deux figures de droite).....	151
Figure III-57 : Mobile TTP 125 : Distribution spatiale des composantes du tenseur de contraintes de Reynolds $\tau_{xx}, \tau_{yy}, \tau_{zz}, \tau_{xy}$ ($N m^{-2}$) obtenue à la vitesse de rotation N_{js} ainsi que la moyenne des contraintes normales τ_N ($N m^{-2}$).	153

Figure III-58 : Mobile EE 150 : Distribution spatiale des composantes du tenseur de contraintes de Reynolds $\tau_{xx}, \tau_{yy}, \tau_{zz}, \tau_{xy}$ ($N m^{-2}$) obtenue à la vitesse de rotation N_{js} ainsi que la moyenne des contraintes normales τ_N ($N.m^{-2}$)..... 154

Figure III-59 : Mobile TTP 125 : Mise en évidence des zones où le ratio entre l'échelle de Kolmogorov locale et la taille moyenne des microporteurs ($250 \mu m$) est : (gauche) inférieur à 1, (milieu) inférieur à 2/3, (droite) inférieur à 1/2 lorsque le mobile tourne à la vitesse de rotation N_{js} 157

Figure III-60 : Mobile TTP 125 : Mise en évidence des zones où le ratio entre l'échelle de Kolmogorov locale et la taille moyenne des microporteurs ($250 \mu m$) est : (gauche) inférieur à 1, (milieu) inférieur à 2/3, (droite) inférieur à 1/2 lorsque le mobile tourne à la vitesse de rotation $2 N_{js}$ 157

Figure III-61 : Mobile EE 150 : Mise en évidence des zones où le ratio entre l'échelle de Kolmogorov locale et la taille moyenne des microporteurs ($250 \mu m$) est : (gauche) inférieur à 1, (milieu) inférieur à 2/3, (droite) inférieur à 1/2 lorsque le mobile tourne à la vitesse de rotation N_{js} 158

Figure III-62 : Mobile EE 150 : Mise en évidence des zones où le ratio entre l'échelle de Kolmogorov locale et la taille moyenne des microporteurs ($250 \mu m$) est : (gauche) inférieur à 1, (milieu) inférieur à 2/3, (droite) inférieur à 1/2 lorsque le mobile tourne à la vitesse de rotation $2 N_{js}$ 158

Figure III-63 : Comparaison des profils axiaux de la composante radiale adimensionnelle $\overline{u_x} / \pi N d$ de la vitesse moyenne : mobile EE 150, mesures 2D P.I.V. (bleu) et 3D P.I.V. (rouge) dans le plan vertical..... 162

Figure III-64 : Comparaison des profils axiaux de la composante axiale adimensionnelle $\overline{u_y} / \pi N d$ de la vitesse moyenne : mobile EE 150, mesures 2D P.I.V. (bleu) et 3D P.I.V. (rouge) dans le plan vertical..... 163

Figure III-65 : Comparaison des profils axiaux de la composante radiale adimensionnelle $\sqrt{\overline{u_x'^2}} / \pi N d$ de la moyenne quadratique de fluctuation de vitesse : mobile EE 150, mesures 2D P.I.V. (bleu) et 3D P.I.V. (rouge) dans le plan vertical. 163

Figure III-66 : Comparaison des profils axiaux de la composante axiale adimensionnelle $\sqrt{\overline{u_y'^2}} / \pi N d$ de la moyenne quadratique de fluctuation de vitesse : mobile EE 150, mesures 2D P.I.V. (bleu) et 3D P.I.V. (rouge) dans le plan vertical. 164

Figure III-67 : Comparaison des profils axiaux de la moyenne temporelle du produit croisé des composantes radiale et axiale de la fluctuation de la vitesse $\overline{u'_x u'_y} / (\pi N d)^2$: mobile EE 150, mesures 2D P.I.V. (bleu) et 3D P.I.V. (rouge) dans le plan vertical..... 164

Table des tableaux

<i>Tableau III-1 : Distribution numérique des composantes radiale, axiale, tangentielle, de la norme de la vitesse moyenne et de la norme de sa projection ($m s^{-1}$) dans le plan vertical de mesure à la vitesse N_{js}.....</i>	<i>126</i>
<i>Tableau III-2 : Distribution numérique de l'énergie cinétique turbulente.....</i>	<i>135</i>
<i>Tableau III-3 : Comparaison des valeurs moyennes et maximales du taux de dissipation de l'énergie cinétique turbulente ($m^2 s^{-3}$) estimées par P.I.V. ou calculées à partir de la puissance globale dissipée.....</i>	<i>146</i>
<i>Tableau III-4 : Comparaison des valeurs maximales du taux de dissipation de l'énergie cinétique turbulente ($m^2 s^{-3}$) observées dans ce travail et dans l'étude de Delafosse et al. (2011).....</i>	<i>148</i>
<i>Tableau III-5 : Percentiles 25, 50, 75, 90 et 99 des distributions des contraintes normales et de cisaillement ($N m^{-2}$) générées par les mobiles TTP 125 et EE 150 à leur vitesse de rotation N_{js} et à $2 N_{js}$.....</i>	<i>152</i>
<i>Tableau III-6 : Pourcentage en volume couvert par les zones problématiques en fonction du critère sélectionné et de la vitesse de rotation du mobile.....</i>	<i>158</i>

Bibliographie

Aubin, J., Mavros, P., Fletcher, D.F., Xuereb, C., Bertrand, J., 2001. Effect of axial agitator configuration (up-pumping, down-pumping, reverse rotation) on flow patterns generated in stirred vessels. International Symposium on Mixing in Industrial Processes, ISMIP 4, 14-16 May 2001, Toulouse, France.

Baldi, S., Hann, D., Yianneskis, M., 2002. On the measurement of turbulence energy dissipation in stirred vessels with PIV techniques. Proceedings of the 11th International Symposium on Applied Laser Techniques in Fluid Mechanic, Lisbon.

Bailly, C., Marsden, O., 2003. Cours de physique des écoulements turbulents dispensé à l'Université de Lyon, Transparent 10 du cours n°7 : Dynamique de la turbulence et théorie de Kolmogorov, <http://acoustique.ec-lyon.fr/cours/cours7.pdf> consulté le 5 décembre 2011.

Bugay, S., 1998. Analyse locale des échelles caractéristiques du mélange: Application de la technique P.I.V. aux cuves agitées. Thèse de doctorat. Université de Toulouse, France.

Cherry, R.S., Papoutsakis, E.T., 1986. Hydrodynamic effects on cells in agitated tissue culture reactors. *Bioprocess Engineering* 1, 29-41.

Cherry, R.S., Papoutsakis, E.T., 1989. Growth and death rates of bovine embryonic kidney cells in turbulent microcarrier bioreactors. *Bioprocess Engineering* 4, 81-89.

Chung, K.H.K, Barigou, M., Simmons, M.J.H., 2007. Reconstruction of 2D flow field inside miniature stirred vessels using 2D P.I.V. technique. *Chemical Engineering Research and Design* 85, 560-567.

Croughan, M.S., Hamel, J.F., Wang, D.I.C., 1988. Effects of microcarrier concentration in animal cell culture. *Biotechnology and Bioengineering* 32, 975-982.

Croughan, M.S., E.S. Sayre, and D.I.C. Wang, 1989. Viscous reduction of turbulence damage in animal-cell culture. *Biotechnology and Bioengineering* 33, 862-872.

Croughan, M.S., Hamel, J.F., Wang, D.I.C., 2006. Hydrodynamic effects on animal cell grown in microcarrier cultures. *Biotechnology and Bioengineering* 95, 295-305.

Delafosse, A., Collignon, M.L., Crine, M., Toye, D., 2011. Estimation of the turbulent kinetic energy dissipation rate from 2D-PIV measurements in a vessel stirred by an axial Mixel TTP impeller. *Chemical Engineering Science* 66, 1728-1737.

Elias, C.B., Desai, R.B., Patole, M. S., Joshi, J.B., Mashelkar, R.A., 1995. Turbulent shear stress- effect on mammalian cell culture and measurement using laser doppler anemometer. *Chemical Engineering Science* 50, 2431-2440.

Escudié, R., Liné, A., 2003. Experimental analysis of hydrodynamics in a radially agitated tank. *AIChE Journal* 49, 585-603.

Gabriele, A., Nienow, A.W., Simmons, M.J.H., 2009. Use of angle resolved PIV to estimate local specific energy dissipation rates for up- and down-pumping pitched blade agitators in a stirred tank. *Chemical Engineering Science* 64, 126-143.

Gadge, R.S., Patwardhan, A.W., Sawant, S.B., Joshi, J.B., 2005. Effect of flow pattern on cellulose deactivation in stirred tank bioreactors. *Chemical Engineering Science* 60, 1067-1083.

Galletti, C. , Brunazzi, E., Pintus, S., Paglianti, A., Yianneskis, M., 2004. A study of reynolds stresses, triples products and turbulence states in a radially stirred tank with 3-D laser anemometry. *Chemical Engineering Research and Design* 82, 1214-1228.

Gregoriades, N., Clay, J., Ma, N., Koelling, K., Chalmers, J.J., 2000. Cell damage of microcarrier cultures as a function of local energy dissipation created by a rapid extensional flow. *Biotechnology Bioengineering* 69, 171-182.

Godoy, R.D., 2008. Lethal and sublethal effects of hydrodynamics forces on animal cell culture. Thèse de doctorat. Ohio State University, Etats-Unis.

Hall, J.F., Barigou, M., Simmons, M.J.H., Stitt, E.H., 2005. Comparative study of different mixing strategies in small high throughput experimentation reactors. *Chemical Engineering Science* 60, 2355-2368.

Joshi, J.B., Elias, C.B., Patole, M.S., 1996. Role of hydrodynamic shear in the cultivation of animal, plant and microbial cells. *Chemical Engineering Journal* 62, 121-141.

Khan, F.R., Rielly, C.D., Brown, D.A.R., 2006. Angle-resolved stereo P.I.V. measurements close to a down-pumping pitched blade turbine. *Chemical Engineering Science* 61, 2799-2806.

Kresta, S.M., Wood, P.E., 1993. The flow field produced by a pitched blade turbine: characterization of the turbulence and estimation of the dissipation rate. *Chemical Engineering Science* 48, 1761-1774

Kumaresan, T., Joshi B.J., 2006. Effect of impeller design on the flow pattern and mixing in stirred tanks. *Chemical Engineering Journal* 115, 173-193.

Micheletti, M., Baldi, S., Yeoh, S., Ducci, A., Papadakis, G., Lee, K., Yianneskis, M., 2004. On spatial and temporal variations and estimates of energy dissipation in stirred reactors. *Chemical Engineering Research and Design* 82, 334-341.

Olmos, E., Barbouche, N., Fournier, F., Blanchard, F., Guedon, E., Marc, A. 2009. Hydrokinetic modelling of animal cell response to turbulent mixing in bioreactors. Proceedings in the 21st annual meeting of the European society for animal cell technology. Dublin, Ireland.

Piirto, M., Eloranta, H., Saarenrinne, P., 2000. Interactive software for turbulence analysis from P.I.V. vector data. Proceedings in the 10th International Symposia on Applications of Laser Techniques to Fluid Mechanics. 10-13 July, Lisbon, Portugal.

Pope S.B., 2000. *Turbulent Flow*. Cambridge University Press, Cambridge.

Saarenrinne, P., Piirto, M., Eloranta, H., 2001. Experiences of turbulence measurements with P.I.V. *Measurement Science Technology* 12, 1904-1910.

Sharp, K., Adrian, R., 2001. P.IV study of small-scale structure around a rushton turbine. *AIChE Journal* 47, 766-778.

Smagorinsky, J., 1963. General circulation experiments with the primitive equation-I. The basic experiment. *Monthly Weather Review* 91, 99-164.

Sheng, J., Meng, H., Fox, R., 2000. A large eddy PIV method for turbulence dissipation rate estimation. *Chemical Engineering Science* 55, 4423-4434.

Stathopoulos, N.A., Hellums, J.D., 1985. Shear stress effects on human embryonic kidney cells in vitro. *Biotechnology and Bioengineering* 27, 1021-1026.

Unadkat, H., Rielly, C.D., Hargrave, G.K., Nagy Z.K., 2009. Application of fluorescence P.I.V. and digital image analysis to measure turbulence properties of solid-liquid stirred suspensions. *Chemical Engineering Research and Design* 87, 573-586.

Venkat, R.V., Stock, L.R., Chalmers, J.J., 1995. Study of hydrodynamics in microcarrier culture spinner vessels: a particle tracking velocimetry approach. *Biotechnology and Bioengineering* 49, 456-466.

Zhou, G., Kresta, S.M., 1996. Impact of geometry on the maximum turbulence energy dissipation rate for various impellers. *AIChE. Journal* 42, 2476-2490

Chapitre IV :

Caractérisation du mélange généré par les mobiles TTP 125 et EE 150 au sein du bioréacteur à cuve agitée utilisé en culture de cellules animales sur microporteurs

Résumé.....	180
1 Introduction.....	181
2 Description globale du mélange <i>via</i> le temps de mélange	182
2.1 Appareils et méthodes.....	182
2.2 Résultats	183
3 Caractérisation locale du mélange <i>via</i> l'analyse des mesures P.L.I.F.	185
3.1 La technique expérimentale P.L.I.F.....	185
3.1.1 Principe	185
3.1.2 Conditions d'acquisition des mesures P.L.I.F.....	187
3.1.3 Traitements des données brutes	188
3.2 Analyse des champs instantanés de concentration	189
3.2.1 Description qualitative	189
3.2.2 Limitations inhérentes à la technique P.L.I.F.	192
3.2.3 Description quantitative	196
4 Discussion des résultats en relation avec les données disponibles sur le métabolisme des cellules animales.....	201
Annexe IV-1 : Détermination de temps de mélange <i>via</i> la technique P.L.I.F.....	205
Liste des symboles.....	207
Table des figures	208
Table des tableaux	210
Bibliographie	211

Résumé

L'étude développée répond à la question suivante : Les gradients de concentration qui apparaissent temporairement dans la cuve lorsqu'une solution est injectée à sa surface, tel que c'est le cas lorsque de la soude concentrée est injectée pour réguler le pH, peuvent-ils avoir un effet sur le métabolisme cellulaire vu les faibles vitesses de rotation employées? Dans l'affirmative, le mélange doit être pris en compte lors de la description Euler-Lagrange de l'écoulement. Dans le cas contraire, son effet peut être négligé et les champs de concentration peuvent être considérés comme constants et homogènes.

Pour répondre à cette question, il faut dans une première étape caractériser le mélange au sein du bioréacteur et ensuite comparer les résultats obtenus aux données disponibles dans la littérature sur les métabolismes des cellules animales.

La caractérisation du mélange a été réalisée par deux approches expérimentales complémentaires :

- La première est une approche globale qui consiste à caractériser le mélange par la mesure d'un temps de mélange *via* la méthode conductimétrique. Les mesures ont été menées à diverses vitesses de rotation et dans des bioréacteurs de tailles croissantes (80 L et 600 L) en similitude géométrique avec le bioréacteur de 20 L. Ces mesures ont permis de calculer la constante de la corrélation de Greenville *et al.* (1995) relative à la géométrie particulière du bioréacteur étudié ici. Elles ont également permis de montrer que les temps de mélange étaient relativement courts, de l'ordre de 20 secondes pour le mobile TTP 125 et 30 secondes pour le mobile EE 150, lorsqu'ils tournent chacun à leur vitesse de rotation N_{js} , permettant le maintien en suspension complète des microporteurs dans la cuve de 20 L.
- La seconde approche est plus locale. Elle consiste à mesurer, par la technique P.L.I.F., l'évolution temporelle des champs de concentration d'un traceur (solution de rhodamine 6G) dans trois plans verticaux de la cuve suite à une injection impulsionnelle. Ces mesures montrent que la dispersion du traceur dans la cuve est, dans un premier temps, contrôlée par la manière dont on injecte la solution dans la cuve avant d'être influencée par les conditions hydrodynamiques qui règnent au sein de l'écoulement. Dans le cas présent, la concentration maximale dans la cuve passe quasi-instantanément d'une valeur de 100% à 30% de la concentration de la solution injectée. Ensuite, la concentration maximale dans les plans de mesure chute rapidement selon une loi en puissance. La fraction du plan de mesure où la concentration est supérieure à un seuil critique, fixé arbitrairement à 1% de la concentration de la solution injectée, n'est que de quelques pourcents.

Dans tous les cas, même le plus défavorable, lors d'une injection de soude très concentrée réalisée à la surface libre du liquide, les temps de mélange mesurés sont de plusieurs ordres de grandeur inférieurs aux temps caractéristiques relatifs à une modification du métabolisme cellulaire. Les éventuelles hétérogénéités de concentration n'auront donc pas d'effet significatif sur le métabolisme cellulaire dans les conditions de mélange étudiées. C'est la raison pour laquelle, dans la suite de ce travail, les champs de concentration seront supposés constants et uniformes au sein de la cuve agitée.

1 Introduction

Le sujet étudié dans ce chapitre est le mélange au sein du bioréacteur et plus particulièrement, l'évolution temporelle des hétérogénéités de concentration qui apparaissent lorsque l'on injecte un petit volume de solution traçante au sein du bioréacteur. Cette situation est, par exemple, couramment rencontrée lors de la régulation de pH où de la soude concentrée est injectée à la surface du bioréacteur. Le but de cette étude est de déterminer si ces gradients de concentration temporairement présents dans le bioréacteur peuvent avoir ou non un impact sur le métabolisme cellulaire et doivent dès lors être pris en compte ou non lors de la description couplée Euler-Lagrange de l'écoulement.

Pour répondre à cette question, le mélange généré par les mobiles TTP 125 et EE 150 est caractérisé selon deux approches.

La première approche est globale et caractérise le mélange à travers un temps de mélange. Ce temps de mélange est estimé par des mesures expérimentales de conductimétrie. Les mesures sont répétées à diverses vitesses de rotation et dans des bioréacteurs de tailles croissantes (80 L et 600 L) en similitude géométrique avec le bioréacteur de 20 L. L'objectif est double. D'une part, ces mesures servent à déterminer la constante de la corrélation de Greenville (Greenville *et al.*, 1995) pour chaque mobile afin d'avoir à disposition une corrélation applicable pour toute étude future de montée en échelle (scale-up) et spécifique à la géométrie particulière du bioréacteur étudiée dans cette thèse (fond hémisphérique, 2 contre-pales). D'autre part, ces mesures servent à établir les temps caractéristiques des processus de mélange. Ces temps seront comparés aux temps caractéristiques du métabolisme cellulaire afin d'établir l'impact des gradients de concentration sur le fonctionnement des cellules animales.

La seconde approche est locale et établit la manière dont la solution traçante se répartit dans la cuve au cours du temps grâce à des mesures expérimentales avec la technique P.L.I.F. (Planar Laser Induced Fluorescent). Cette technique est limitée à des cuves de petits volumes. Les mesures ont donc été réalisées dans divers plans verticaux de la cuve de 20L. L'intérêt de ce type d'étude est de caractériser l'évolution temporelle des champs de concentration. Elle permet une description plus complète des processus de mélange que la mesure du temps de mélange, car outre l'information temporelle, elle apporte également une information relative à la distribution spatiale des concentrations.

Dans les deux premières parties de ce chapitre, les outils expérimentaux utilisés pour chaque approche seront présentés et les résultats obtenus seront décrits. Ces résultats seront ensuite discutés à la lumière des données disponibles sur le métabolisme cellulaire dans la troisième partie de ce chapitre.

Ce chapitre est, en quelle sorte, une parenthèse dans la méthodologie développée dans cette thèse. Nous l'avons néanmoins placé à cette position, et non à la fin de la thèse car le sujet abordé présente, selon notre point de vue, quelques caractéristiques eulériennes et lagrangiennes à la fois. Nous avons trouvé que c'était, dès lors, une bonne transition.

2 Description globale du mélange via le temps de mélange

2.1 Appareils et méthodes

Le temps de mélange est défini comme le temps nécessaire pour atteindre un niveau prédéfini d'homogénéité à l'échelle macroscopique après injection dans le bioréacteur d'une solution traçante. Il existe différentes techniques pour déterminer ce temps de mélange. Dans ce travail, nous avons successivement utilisé la technique conductimétrique dans trois bioréacteurs géométriquement similaires de 20, 80 et 600 L. Une petite quantité d'une solution saturée en NaCl (359 g L^{-1}) est injectée à la surface libre du liquide. Le point d'injection choisi dans ce travail est indiqué sur la Figure IV-1. Les quantités injectées dans chaque cuve ainsi que le temps nécessaire pour réaliser l'injection sont présentés dans le Tableau IV-1. La sonde conductimétrique utilisée durant l'étude est de fabrication maison (Figure IV-2). Elle est composée d'un fil de platine entouré autour d'un cylindre en PVC sur une hauteur de 5 cm. Ce fil de platine est connecté à une carte électronique. La sonde délivre un signal électrique proportionnel à la conductivité locale autour du fil de platine, qui est elle-même directement proportionnelle à la concentration en NaCl. Le signal est enregistré à une fréquence de 2 Hz à l'aide du logiciel Labview (version 2.5.2). L'extrémité inférieure de la sonde est située à 9 cm de la surface libre du liquide. La position de la sonde par rapport au point d'injection est indiquée sur la Figure IV-1.

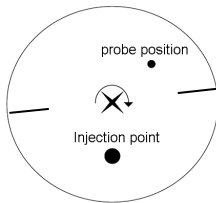


Figure IV-1 : Localisation du point d'injection de la solution de NaCl et de la position de la sonde conductimétrique lorsque la cuve est vue du haut.



Figure IV-2 : Sonde de conductimétrie « maison ».

Tableau IV-1 : Volume de NaCl injecté dans chaque cuve et temps d'injection correspondant.

Volume de la cuve (L)	Volume injecté (mL)	Temps d'injection (s)
20	40	1.5
80	150	3
600	1000	5

Comme mentionné ci-dessus, la valeur numérique du temps de mélange dépend du critère sélectionné pour définir l'homogénéité du traceur au sein de la cuve. Dans la littérature scientifique, des critères d'homogénéité de 90%, 95% ou 99% sont souvent mentionnés. Dans ce travail, le critère de 95% a été choisi. Le temps de mélange correspondant est donc le temps nécessaire pour la conductivité de la solution autour de la sonde ne s'éloigne plus de plus de 5% de la valeur asymptotique finale mesurée.

Les temps de mélange ont été déterminés pour chaque mobile aux vitesses de rotation indiquées dans le Tableau IV-2. Ces vitesses ont été sélectionnées de manière à conserver une même gamme de valeurs du nombre de Reynolds (7500-208 000) dans les trois volumes de bioréacteur étudiés. Pour chaque condition d'agitation, l'injection du traceur et la mesure du temps de mélange sont répétées deux fois. Notons que, comme le montre le Tableau IV-2, les mesures de temps de mélange n'ont pas pu être faites dans le bioréacteur de 600 L pour le mobile TTP 125 ($d/T=0.4$) vu la non disponibilité de ce mobile pour cette cuve. Son équivalent en $d/T=0.5$ était par contre disponible, c'est pourquoi les temps de mélange ont été mesurés pour ce mobile dans les cuves de 20, 80 et 600 L.

Tableau IV-2 : Vitesse de rotation du mobile utilisée pour déterminer les temps de mélange dans les différentes tailles de bioréacteur.

Mobile	Volume de la cuve (L)	Vitesses de rotation (rpm)
TTP 125 ($d/T=0.4$)	20	60, 120, 170
	80	60, 90, 120
EE 150 ($d/T=0.5$)	20	20, 50, 85, 120
	80	20, 40, 50
	600	10, 15, 20
TTP 150 ($d/T=0.5$)	20	40, 85, 120
	80	40, 60, 80, 100
	600	10, 15, 20, 30, 50

2.2 Résultats

Les temps de mélange t_M mesurés dans les conditions reprises dans le Tableau IV-2 sont présentés dans les Figures IV-3 et IV-4, en fonction de la vitesse de rotation. Sur base de ces points expérimentaux, le paramètre A de la corrélation de Greenville (Greenville *et al.*, 1995) a été déterminé pour chaque mobile par la méthode des moindres carrés :

$$t_M = A \left(\frac{1}{N} \right) \left(\frac{1}{N_p^{1/3}} \right) \left(\frac{T}{d} \right)^2 \quad (IV-1)$$

Cette corrélation est intéressante car elle intègre toutes les variables qui influencent le temps de mélange t_M . Il s'agit de la vitesse de rotation du mobile N , du type de mobile *via* son nombre de puissance N_p et du *ratio* entre le diamètre du mobile d et le diamètre de la cuve T . Sur les Figures IV-3 et IV-4, les courbes continues correspondent aux valeurs de temps de mélange prédites par la corrélation de Greenville.

L'analyse de ces résultats conduit à deux commentaires.

Le premier concerne les valeurs de temps de mélange mesurées. Les Figures IV-3 et IV-4 montrent que les temps de mélange mesurés dans les diverses cuves sont relativement courts. Dans la plus grande cuve (600 L) et à la vitesse de rotation la plus faible (10 rpm), ils sont de l'ordre de 50 s pour le mobile EE 150 ($d/T=0.5$) et 100 s pour le mobile TTP 150 ($d/T=0.5$). De plus, ils chutent à des valeurs de l'ordre respectivement de 10 s et 20 s lorsque la vitesse

de rotation du mobile augmente car, comme le montre la corrélation de Greenville, le temps de mélange est inversement proportionnel à la vitesse de rotation du mobile, indépendamment de la taille de la cuve. Notons encore qu'à la vitesse de rotation N_{js} pour la cuve de 20 L, les temps de mélange valent respectivement environ 20 s pour le mobile TTP 125 ($N_{js} = 50$ rpm) et environ 30 s pour le mobile EE 150 ($N_{js}=20$ rpm).

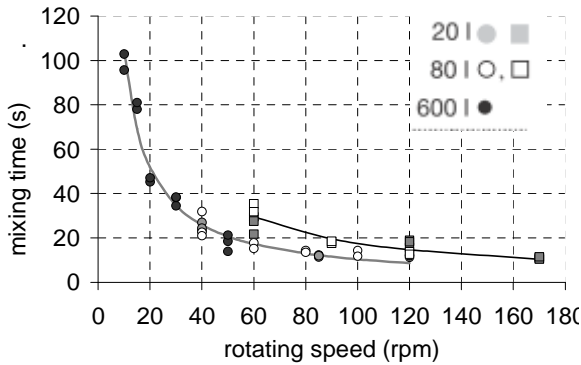


Figure IV-3 : Temps de mélange expérimentaux mesurés par conductimétrie dans des cuves agitées respectivement par les mobiles TTP 125 ($d/T=0.4$, \square , \blacksquare , \square) TTP 150 ($d/T=0.5$, \circ , \bullet , \bullet) Les courbes correspondent à la corrélation de Greenville où le paramètre A vaut resp. 3.67 et 3.34.

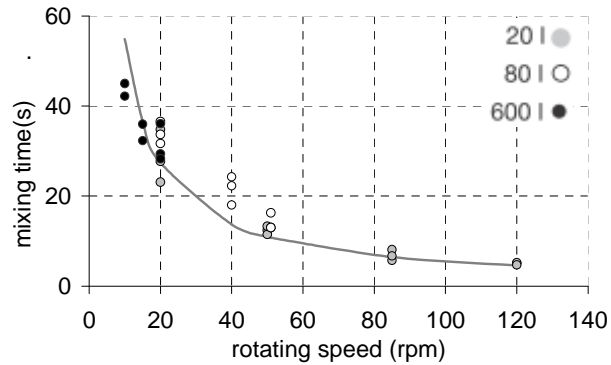


Figure IV-4 : Temps de mélange expérimentaux mesurés par conductimétrie dans des cuves agitées respectivement par le mobiles EE 150 ($d/T=0.5$, \circ , \bullet , \bullet) La courbe correspond à la corrélation de Greenville où le paramètre A déterminé par ajustement par la méthode des moindres carrés vaut 2.95.

Le deuxième commentaire concerne la corrélation de Greenville. Un bon accord est observé entre les valeurs prédites par cette corrélation après ajustement de son paramètre et les mesures expérimentales. Néanmoins, la valeur du paramètre A, qui vaut respectivement 3.67 ± 0.32 , 3.34 ± 0.15 et 2.95 ± 0.27 pour les mobiles TTP 125 ($d/T=0.4$), TTP 150 ($d/T=0.5$) et EE 150 ($d/T=0.5$) est très différente de la valeur 5.2 ± 0.52 obtenue par Greenville *et al.* (1995). D'où cette différence peut-elle bien provenir ? Pourquoi la corrélation établie ici prédit-elle des temps de mélange plus courts que celle de Greenville ? Pour établir la valeur de 5.2, Greenville et ses collaborateurs ont mesuré des temps de mélange avec trois sondes conductimétriques, disposées comme illustré sur le schéma de la Figure IV-5. Ces mesures sont réalisées dans des cuves à fond plat dont les diamètres valent respectivement 0.30, 0.61, 1.83 et 2.97 m (soit des volumes de 21, 170, 4813 et 9726 L), équipées de quatre contre-pales et mélangées par divers types de mobile (turbine de Rushton, mobile à pales profilées, turbine à pales inclinées ou à pales droites...). Le diamètre des mobiles testés varie entre $T/3$ et $T/2$. Les mobiles sont placés au tiers de la hauteur de liquide. Comme le montre la Figure IV-6, extraite de la publication de Houcine *et al.* (2000), le temps de mélange mesuré par chaque sonde, en régime turbulent, est sensiblement le même, à l'exception de celui mesuré par la sonde située dans le jet à la sortie des pales du mobile qui est légèrement plus faible. Pour établir le paramètre de sa corrélation, Greenville a choisi comme temps de mélange la moyenne des temps de mélange mesuré par les trois sondes. L'écart-type standard de son paramètre A pour l'ensemble des conditions testées est de $\pm 10\%$. Plusieurs pistes peuvent être évoquées pour expliquer la différence des résultats obtenus ici vis-à-vis des travaux de Greenville *et al.* Une première piste pourrait être la différence de positionnement de la sonde vis-à-vis du point d'injection. Cependant, même si cela avait une influence, vu que la sonde

et le point d'injection sont tous deux près de la surface du liquide, cela devrait entraîner, comme le montre la Figure IV-6 une surestimation du temps de mélange ; ce qui est l'inverse de ce qu'on observe ici puisqu'on mesure des temps de mélange plus courts que ceux prédits par Greenville *et al.* Une autre piste plus probable est l'effet de la géométrie de la cuve. Contrairement aux cuves utilisées par Greenville *et al.*, la cuve utilisée ici a un fond hémisphérique et seulement deux contre-pales. Comme le montrent les travaux de Houcine *et al.* (2000), les temps de mélange mesurés dans des cuves à fond hémisphérique sont approximativement 10% plus faibles que ceux mesurés dans des cuves à fond plat. Par contre, la présence de quatre contre-pales au lieu de deux devrait contribuer à réduire le temps de mélange, en augmentant la puissance globale dissipée et le débit de pompage comme cela a été mis en évidence en Annexe II-3 du Chapitre II. Au vu de ces effets antagonistes, il est difficile de dire si les différences géométriques entre la cuve étudiée ici et celles employées par Greenville *et al.* expliquent la différence de résultats observés.

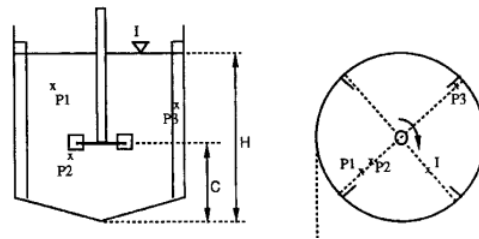


Figure IV-5 : Position relative du point d'injection et des sondes conductimétriques lors de l'étude des temps de mélange réalisée par Greenville *et al.* (1995). Images extraites de la publication de Houcine *et al.* (2000).

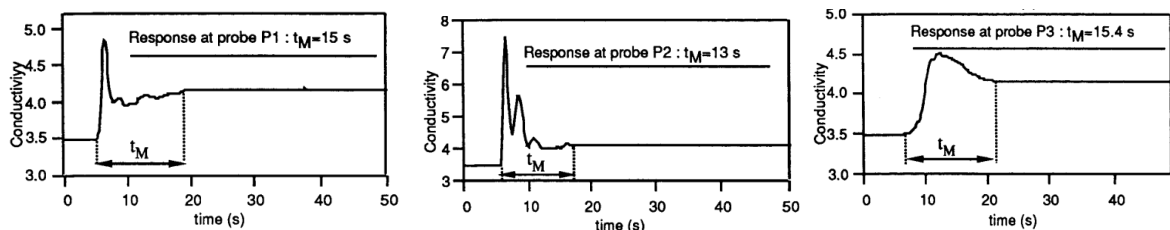


Figure IV-6 : Évolution temporelle de la conductivité mesurée à chaque sonde et détermination du temps de mélange correspondant. Résultats tirés de la publication de Houcine *et al.* (2000).

3 Caractérisation locale du mélange via l'analyse des mesures P.L.I.F.

3.1 La technique expérimentale P.L.I.F.

3.1.1 Principe

La technique P.L.I.F. permet de mesurer des champs instantanés de concentration dans un plan éclairé par un laser. Le dispositif P.L.I.F. utilisé dans ce travail est composé des mêmes appareils (caméra, laser, boîtier de synchronisation, ordinateur, logiciel) que le dispositif P.I.V. commercialisé par la société Dantec Dynamics. La principale différence entre la technique P.I.V. et la technique P.L.I.F. est le type de traceur utilisé : les particules micrométriques utilisées en P.I.V. sont remplacées par une solution fluorescente (solution aqueuse de rhodamine 6G) qui est injectée dans la cuve. Les mesures permettent de suivre

l'évolution au cours du temps de la distribution spatiale de la concentration de cette substance fluorescente.

Le laser Nd-Yag ponctuel est ici aussi étendu en un plan à l'aide d'une lentille. Il pulse à une fréquence maximale de 18 Hz. Tout comme lors des mesures P.I.V., le laser éclaire un plan vertical de la cuve. Pour les mesures P.L.I.F., ce plan est décalé de 5 mm par rapport à l'axe d'agitation afin d'éviter la formation d'une zone d'ombre derrière l'axe et ainsi pouvoir observer l'évolution de la concentration dans l'ensemble du plan. Les photons émis par le laser à une longueur d'onde de 532 nm sont progressivement absorbés par des molécules de rhodamine 6G situées dans le plan du laser. Les molécules, qui ont été excitées, réémettent ensuite de la lumière à des longueurs d'onde comprises entre 540 nm et 640 nm. Cette lumière émise est enregistrée par une caméra dont l'axe optique est perpendiculaire au plan éclairé par le laser et qui est équipée d'un filtre coupant les longueurs d'onde inférieures à 570 nm et donc celles émises par le laser. Le résultat brut obtenu est donc une succession d'images dans lesquelles le niveau de gris de chaque pixel dépend de la fluorescence émise par les molécules de rhodamine et donc de leur concentration.

En effet, une expression théorique basée sur la loi de Beer-Lambert permet de relier, en chaque point du plan de mesure, la fluorescence réémise par les molécules de rhodamine excitées à la concentration en rhodamine. L'intensité de la fluorescence (F) varie avec la concentration en rhodamine 6G (C) et l'énergie fournie par le laser (E) dans chaque volume élémentaire V_c délimité par l'épaisseur du laser (1mm) et la surface correspondant à 1 pixel de l'image acquise par la caméra. D'autres paramètres optiques entrent également en jeu. Ils sont considérés comme constants au cours d'une même expérience et sont rassemblés dans le paramètre constant f_{optic} . Lorsque la loi de Beer-Lambert est intégrée sur chaque volume élémentaire V_c , la relation suivante est obtenue :

$$F = f_{optic} A_c V_c E C Q_\lambda(T) \quad (IV-2)$$

avec $A_c = e^{-aLC}$ qui correspond aux phénomènes d'absorption qui doivent être intégrés sur le chemin optique suivi par la lumière. Le paramètre a est le facteur d'absorption du liquide.

$Q_\lambda(T)$ qui est le coefficient quantique des molécules fluorescentes (c'est-à-dire la fraction de l'énergie absorbée qui est réémise) à la température T et à la longueur d'onde d'excitation λ .

Le coefficient quantique des molécules de rhodamine 6G n'est pas sensible aux fluctuations de température. Cette grandeur ainsi que le coefficient optique f_{optic} et le volume élémentaire peuvent donc être rassemblés dans une constante commune $\alpha_c = f_{optic} V_c Q_\lambda$. De plus, pour de faibles concentrations en rhodamine 6G, les phénomènes d'absorption sont faibles. Dès lors, la valeur du coefficient A_c qui intervient dans l'Equation IV-2 est proche de 1. Connaissant également l'énergie du laser E , la concentration en chaque point du plan de mesure peut être déterminée à partir de la fluorescence émise et donc du niveau de gris enregistré en chaque pixel par la caméra par la Relation IV-3, dérivée de la Formule IV-2:

$$C = \frac{F}{\alpha_c E} \quad (IV-3)$$

Le terme de proportionnalité α_c entre la fluorescence F et la concentration C , pour un niveau E de l'énergie du laser est déterminé pixel par pixel à l'aide d'une courbe de calibration. La procédure de calibration consiste à successivement remplir la cuve de plusieurs solutions de concentration homogène connue en la substance fluorescence et, pour chaque solution, d'acquérir des images P.L.I.F.. La courbe de calibration permet non seulement le calcul du paramètre α_c , mais également de déterminer la concentration limite $C_{critique}$ au-delà de laquelle la relation entre la concentration et la fluorescence n'est plus linéaire. Avec le dispositif utilisé, cette concentration limite vaut $60 \mu\text{g L}^{-1}$.

3.1.2 Conditions d'acquisition des mesures P.L.I.F.

Les champs de concentration mesurés par la technique P.L.I.F. sont limités spatialement dans le plan de mesure, qui est le plan vertical coupant la cuve juste devant l'axe du mobile. Cependant, comme illustré à la Figure IV-7, lorsqu'un faible volume de Rhodamine 6G est injecté à la surface du liquide, le nuage de Rhodamine 6G ne s'étend pas uniquement dans un plan vertical parallèle à l'axe du mobile. Sous l'effet du mouvement de rotation du mobile, il s'étend également dans la direction perpendiculaire au plan de mesure. Cette dispersion ne peut donc pas être suivie par des mesures P.L.I.F. réalisées dans un seul plan. Pour compenser en partie cette limitation de la technique, le « suivi » de la dispersion du nuage de rhodamine est réalisé dans 3 plans de mesure de plus en plus éloignés du point d'injection et qui permettent donc d'observer le processus de dispersion du traceur à trois « instants » différents. Le mot suivi est mis ci-dessus entre guillemets car la mesure dans les trois plans n'est pas réalisée de manière simultanée mais de manière successive suite à trois injections différentes. Cette manière de procéder revient à poser l'hypothèse que, dans les mêmes conditions d'agitation et d'injection, la solution traçante se répartit en moyenne de la même manière. Pour des raisons pratiques, l'éloignement progressif du plan de mesure par rapport au point d'injection, n'est pas réalisé en déplaçant le laser, mais plutôt en modifiant la position du point d'injection (Figure IV-8) dans la cuve. Simultanément, les contre-pales ont également été déplacées de manière à rester dans la même configuration expérimentale, en conservant la même distance entre les contre-pales et le point d'injection. Tout se passe donc comme si la cuve et le dispositif d'injection subissait une rotation de 18° entre chaque configuration. Afin, qu'à chaque instant, la concentration en rhodamine 6G dans le plan de mesure reste dans la gamme linéaire, entre 0 et $60 \mu\text{g L}^{-1}$, la concentration en Rhodamine 6G de la solution injectée a été adaptée en fonction de la distance entre le point d'injection et le plan de mesure : une injection de 5 mL d'une solution de $100 \mu\text{g L}^{-1}$ au point 1, de 5 mL d'une solution de $400 \mu\text{g L}^{-1}$ au point 2 et de 5 mL d'une solution de $800 \mu\text{g L}^{-1}$ au point 3. Chaque injection est répétée 3 fois pour chaque condition d'agitation. L'augmentation de la concentration moyenne en rhodamine 6G dans la cuve après dispersion de chaque injection est très faible ; ces augmentations valant respectivement $0.025 \mu\text{g L}^{-1}$, $0.1 \mu\text{g L}^{-1}$ et $0.2 \mu\text{g L}^{-1}$. Il est donc possible d'étudier la dispersion de la solution traçante dans les trois plans et aux vitesses de rotation des mobiles TTP 125 et EE 150 indiquées dans le Tableau IV-3 sans devoir vidanger la cuve.

Tableau IV-3 : Vitesses de rotation auxquelles ont été effectuées les mesures P.L.I.F.

Mobile	Vitesse de rotation (rpm)
TTP 125	$50 = N_{js}$, 67, 75, 85, 102, 120, 150
EE 150	$20 = N_{js}$, 30, 40, 50, 67, 75, 85, 90

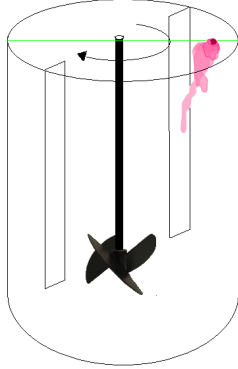


Figure IV-7 : Illustration de la dispersion du nuage de Rhodamine 6G dans la direction axiale et de sa rotation dans la direction transversale.

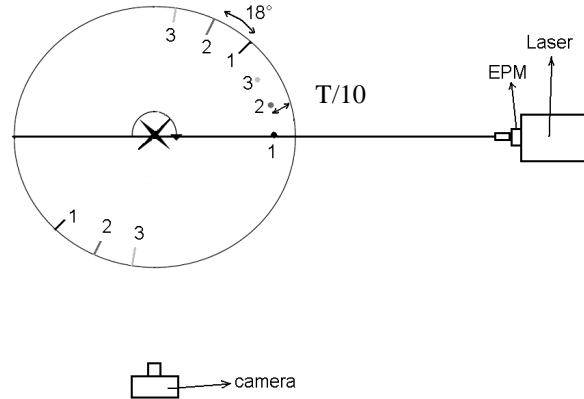


Figure IV-8 : Positions relatives du plan du laser, des points d'injection et des contre-pales.

3.1.3 Traitements des données brutes

Les données brutes sont, pour chaque injection, une succession d'images acquises à une fréquence de 18 Hz et contenant 1024×1280 pixels². Le niveau de gris de chaque pixel, exprimé sur une échelle à 4096 divisions (12 bits), dépend de la concentration en rhodamine 6G.

La première étape du traitement est logiquement de convertir ces images exprimées en niveau de gris en champs exprimés en concentration ($\mu\text{g L}^{-1}$) grâce aux droites de calibration préalablement mesurées en chaque pixel. Ces droites de calibration ont été établies pour 20 niveaux de concentration compris entre 0 et $50 \mu\text{g L}^{-1}$.

En pratique, les droites de calibration ont été mesurées à la fin de la campagne de mesure décrite au point précédent, en injectant à 20 reprises 5 mL d'une solution $10\,000 \mu\text{g L}^{-1}$, ce qui entraîne après l'homogénéisation de chaque injection, une augmentation de la concentration moyenne de rhodamine dans la cuve de $2.5 \mu\text{g L}^{-1}$. Pour chaque concentration, 50 images sont enregistrées afin d'établir les droites de calibration en chaque pixel. L'élaboration des droites de calibration ainsi que la conversion des images exprimées en niveaux de gris en champs exprimés en concentration sont réalisés dans l'environnement du logiciel Dynamics Studio (version 3, Dantec S.A.) fourni avec le dispositif expérimental.

Les deuxième et troisième étapes du traitement sont intrinsèquement liées à la manière dont les mesures de la campagne décrite au Point 3.1.2 ont été menées. Puisque les injections de rhodamine sont réalisées les unes à la suite des autres sans vidanger la cuve, il est nécessaire de soustraire des champs instantanés de concentration la valeur de la concentration moyenne dans la cuve avant l'injection. De même, puisque les solutions injectées aux trois positions mentionnées sur la Figure IV-8 ont des concentrations différentes (100 , 400 et $800 \mu\text{g L}^{-1}$), il faut normer les concentrations obtenues en chaque point par la concentration de la solution injectée afin de pouvoir comparer les résultats obtenus dans les trois plans.

3.2 Analyse des champs instantanés de concentration

3.2.1 Description qualitative

Les mesures P.L.I.F. sont réalisées dans trois plans verticaux différents afin d'être à même de suivre le processus de dispersion et de mélange à trois instants différents. Cet objectif a été atteint en adaptant la distance entre le plan de mesure et le point d'injection (Figure IV-8, page 188) ainsi que la concentration de la solution injectée.

L'analyse des images acquises dans les plans 1, 2 et 3 (Figures IV-9, IV-10 et IV-11 respectivement) montre que le processus de mélange résulte de deux phénomènes : une première dilution lors de l'injection de la solution traçante dans la cuve, qui semble être contrôlée par les conditions d'injection, et une dilution et dispersion subséquente, qui dépend des conditions hydrodynamiques au sein du bioréacteur. Les phénomènes se produisant lors de l'injection de la solution traçante sont observables uniquement dans le plan 1, qui contient le point d'injection. La dispersion et la dilution du nuage de traceur est par contre observable dans tous les plans pendant une durée qui dépend du temps que met le nuage à traverser et à quitter le plan.

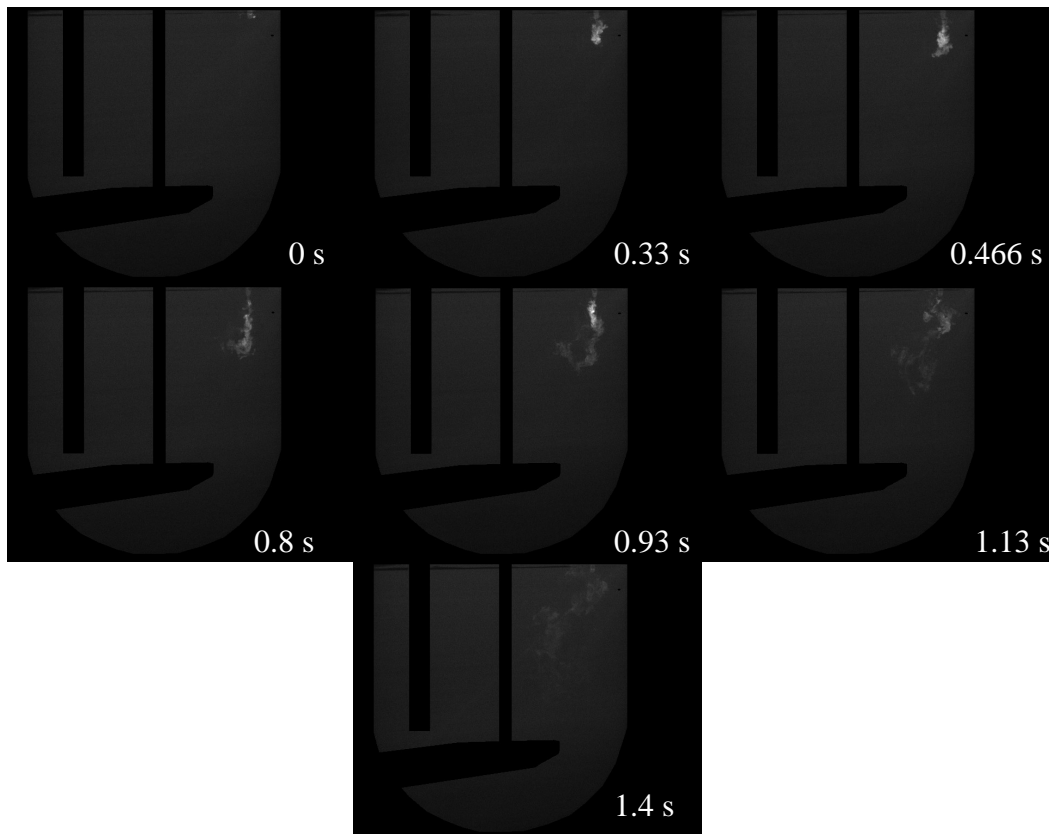


Figure IV-9 : Observations des images (en niveaux de gris) acquises dans le plan 1 lorsque 5 mL d'une solution $100 \mu\text{g L}^{-1}$ de rhodamine 6G sont injectés à la surface libre de l'eau à 3 cm (T/10) du bord de la cuve et lorsque le mobile TTP 125 tourne à la vitesse de rotation N_{js} (50 rpm).

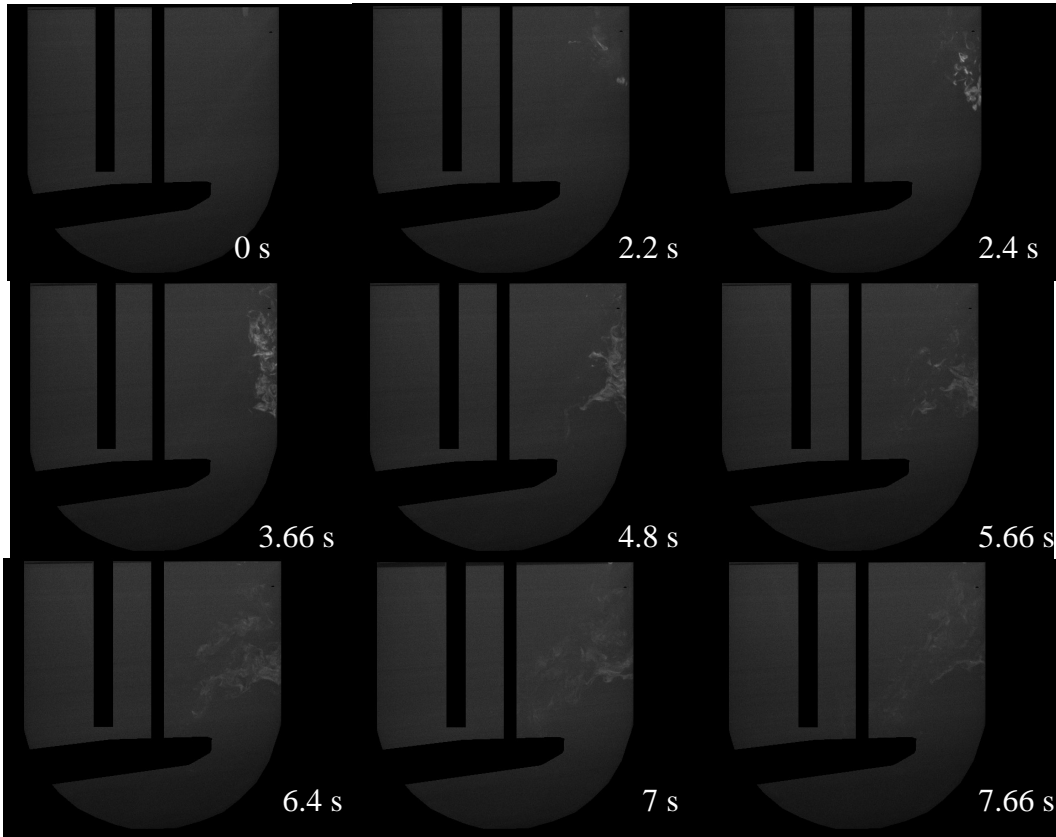


Figure IV-10 : Observations des images (en niveaux de gris) acquises dans le plan 2 lorsque 5 mL d'une solution $400 \mu\text{g L}^{-1}$ de rhodamine 6G sont injectés à la surface libre de l'eau à 3 cm ($T/10$) du bord de la cuve et lorsque le mobile TTP 125 tourne à la vitesse de rotation N_{js} (50 rpm).

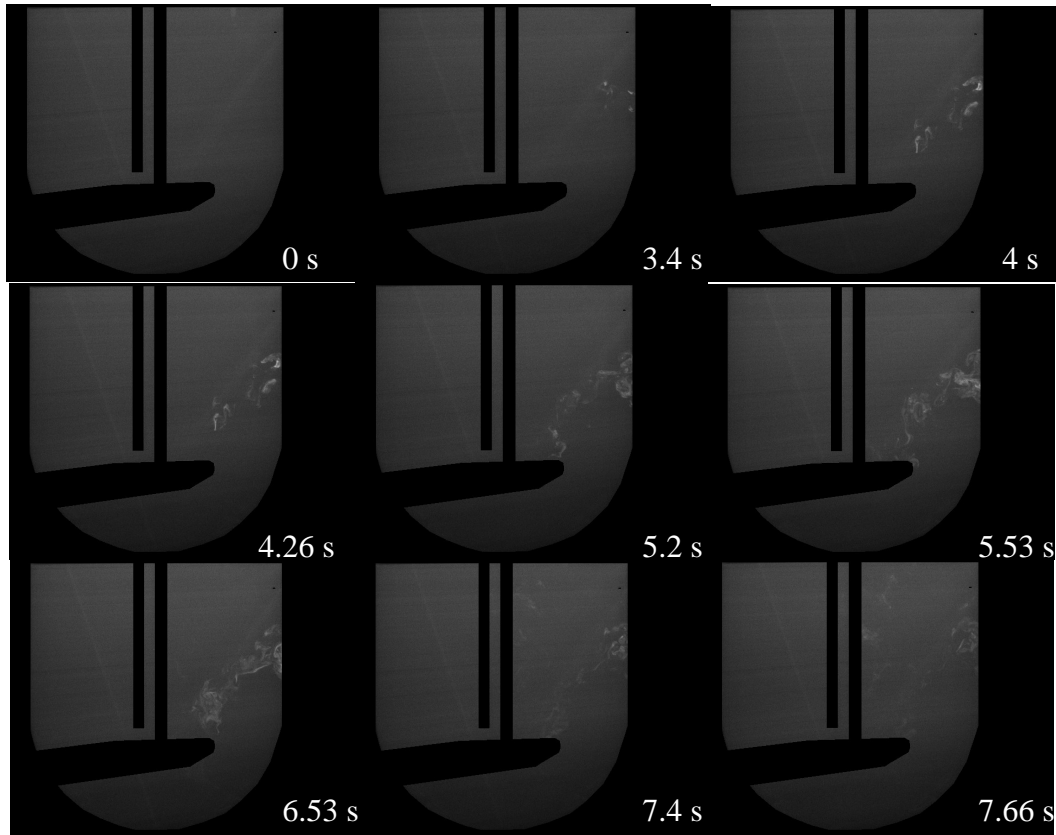


Figure IV-11 : Observations des images (en niveaux de gris) acquises dans le plan 3 lorsque 5 mL d'une solution $800 \mu\text{g L}^{-1}$ de rhodamine 6G sont injectés à la surface libre de l'eau à 3 cm ($T/10$) du bord de la cuve et lorsque le mobile TTP 125 tourne à la vitesse de rotation N_{js} (50 rpm).

Décrivons plus en détails les deux phénomènes.

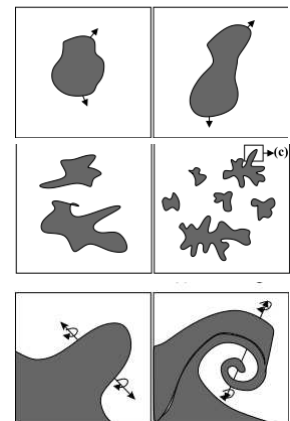
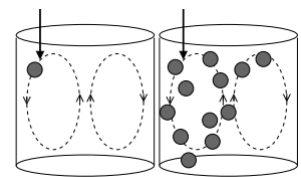
L'injection des 5 mL de la solution $100 \mu\text{g L}^{-1}$ de rhodamine 6G est réalisée à la surface libre de l'eau contenue dans la cuve à l'aide d'une pipette automatique dont la pointe a été coupée afin d'augmenter son diamètre (3 mm), d'élargir ainsi le jet et réduire sa vitesse de pénétration dans le liquide. L'injection dure approximativement une seconde. Pendant cette période, la valeur maximale de niveau de gris des images de la Figure IV-9 est plus ou moins constante et localisée exclusivement dans le jet. Cette valeur semble de plus, d'après les autres mesures réalisées dans ce plan, être indépendante de la vitesse de rotation et du type de mobile utilisé. Elle dépend donc exclusivement des conditions d'injection, *i.e.* de la concentration de la solution traçante injectée et de la vitesse superficielle du jet, qui dépend elle-même du volume injecté, du temps d'injection et du diamètre de la pointe de la pipette. Cette hypothèse aurait pu être vérifiée en testant d'autres conditions d'injection, mais ce n'était pas le but de la présente étude. Nous avons donc préféré rester dans des conditions d'injection standardisées, similaires à celles employées en culture de cellules.

Sur base de l'observation des images des Figures IV-9, IV-10 et IV-11, il semble que la dispersion du nuage de rhodamine 6G résulte de deux mécanismes :

- Le déplacement du nuage au sein du bioréacteur selon l'écoulement moyen. On observe en effet qu'au cours du temps, le nuage descend vers la zone balayée par le mobile et sort des plans de mesure car il suit le mouvement de rotation du fluide autour de l'axe du mobile ;
- L'incorporation de filets de fluide voisins par interaction avec les tourbillons locaux présents dans l'écoulement turbulent. On observe en effet que le nuage de rhodamine s'étend en prenant une structure plus filamenteuse.

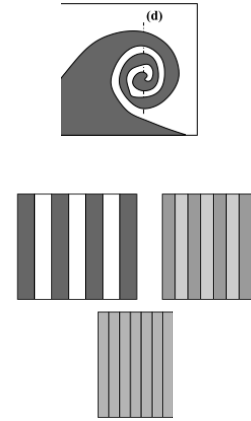
Ces observations coïncident parfaitement avec le modèle de mélange proposé par Baldyga et Pohorecki (1995). Ces derniers décrivent le mélange *via* quatre mécanismes intervenant à des échelles de tailles et de temps différentes :

- Le mécanisme de macromélange qui a lieu à l'échelle macroscopique. Selon ce mécanisme, les paquets de traceur sont dispersés dans la cuve en suivant la structure de l'écoulement moyen et sans modification de leur taille initiale obtenue après injection ;
- Le mécanisme de mésomélange qui a lieu dans la gamme d'échelle s'étendant entre la taille des paquets de traceur initiaux et l'échelle de Kolmogorov. Selon ce mécanisme, les paquets de fluide se divisent en plus petits paquets car ils subissent des contraintes de cisaillement lorsqu'ils interagissent avec les tourbillons locaux de l'écoulement turbulent ;
- Le mécanisme de micromélange par incorporation qui a lieu dans la gamme d'échelle où les tourbillons sont relativement stables (1 à 12 fois l'échelle de Kolmogorov) du fait de l'équilibre entre l'étirement provoqué par les contraintes



turbulentes et la dissipation due aux contraintes visqueuses. Selon ce mécanisme, ces tourbillons s'enroulent sur eux-mêmes incorporant ainsi au sein des paquets de traceur du fluide de la cuve et formant ainsi des structures lamellaires ;

- Le mécanisme de micromélange par diffusion qui intervient dans une gamme d'échelles inférieures à l'échelle de Kolmogorov. D'après ce mécanisme, les gradients de concentration au sein des structures lamellaires disparaissent par diffusion moléculaire.



Le mélange de la solution traçante est donc gouverné par la structure de la composante moyenne de l'écoulement ($\overline{u_x}, \overline{u_y}, \overline{u_z}$) et par les propriétés locales (k, ε) de la composante turbulente de l'écoulement. Or, au chapitre précédent, nous avons montré que les grandeurs qui caractérisent ces deux composantes sont fonction du type de mobile employé et que leur valeur absolue (*i.e.* non normée) dépend de la vitesse de rotation de ce mobile. L'effet du mobile et de sa vitesse de rotation sur le mélange seront illustrés dans la section présentant l'analyse quantitative des mesures P.L.I.F..

3.2.2 Limitations inhérentes à la technique P.L.I.F.

La technique P.L.I.F. souffre de deux limitations dont il est important d'avoir conscience avant toute analyse quantitative des résultats. Ces deux limitations sont des mesures entachées d'un bruit expérimental relativement important et qui restent limitées en un plan. Les paragraphes suivants mettent en évidence l'implication de ces limitations sur l'analyse des résultats.

Pour quantifier l'erreur expérimentale, la méthodologie suivante a été appliquée sur les 50 images qui correspondent à des champs homogènes et qui ont été enregistrées à chaque niveau de concentration pour établir les droites de calibration :

- Conversion des images en champs de concentration ;
- Calcul, à partir du set de 50 images correspondant à un niveau de concentration donné, de l'écart-type de concentration observé en chaque pixel (σ_{pixel});
- Calcul de la moyenne (σ_{moyen}) et du percentile 99 (σ_{max}) de la distribution des valeurs d'écart-type observées au sein du plan de mesure.

Les deux premières étapes sont réalisées à l'aide du logiciel Dynamics Studio (version 3) et la troisième est réalisée à l'aide du tableur Excel (édition 2003). L'erreur expérimentale est donc caractérisée par deux valeurs : la moyenne qui, comme son nom l'indique, correspond à l'erreur moyenne rencontrée dans le plan de mesure et le percentile 99 qui correspond aux points les plus défavorables, où l'erreur est maximale.

La Figure IV-12 présente la distribution des valeurs de concentration recalculées en différents points dans 50 images acquises pour un même niveau de concentration homogène de $5 \mu\text{g L}^{-1}$. En l'absence d'erreur expérimentale et vu que les courbes de calibration sont établies pour

chaque pixel, un seul bâtonnet devrait apparaitre à la valeur $5 \mu\text{g L}^{-1}$. La présence des erreurs expérimentales entraine un étalement des valeurs autour de cette valeur moyenne.

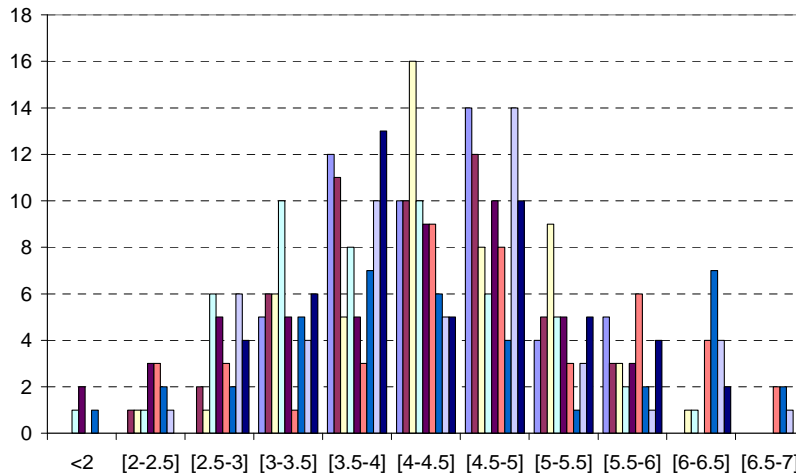


Figure IV-12 : Distribution des concentrations observées en sept points différents dans 50 images correspondant à une concentration moyenne de $5 \mu\text{g L}^{-1}$.

On voit que la distribution des valeurs est proche d'une loi normale (courbe de Gauss). Des distributions similaires ont été obtenues aux différentes concentrations. Dans une distribution de ce type, l'intervalle de confiance à 95% des valeurs de concentration recalculées en chaque pixel est donné par $[C_{\text{moyen,pixel}} \pm 2.01 \sigma_{\text{pixels}}]$, si σ_{pixels} est calculé, en chaque point à partir de 50 valeurs expérimentales (49 degrés de liberté). Pour une concentration en solution donnée, la largeur du demi-intervalle de variation, autour de leur valeur moyenne, des valeurs de concentration potentiellement recalculées dans le plan de mesure sera donc estimée par le double de l'erreur moyenne ($2 \sigma_{\text{moyen}}$) et par le double de l'erreur maximale ($2 \sigma_{\text{max}}$).

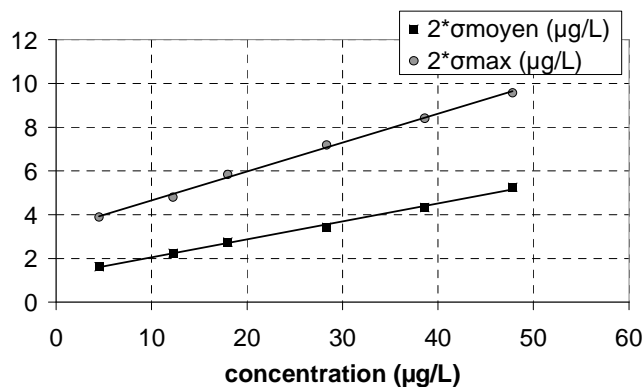


Figure IV-13 : Evolution du double de la valeur moyenne et de la valeur du percentile 99 de la distribution d'écart type observée dans le plan de mesure.

La Figure IV-13 présente ces largeurs de demi-intervalle de variation pour chaque niveau de concentration. On y observe que l'erreur semble évoluer linéairement avec le niveau de concentration. La constante de proportionnalité est cependant inférieure à 1. Ainsi, aux faibles concentrations, l'erreur est importante. Par exemple pour une concentration moyenne de $5 \mu\text{g L}^{-1}$, l'erreur moyenne ($2 \sigma_{\text{moyen}}$) vaut 35% de la concentration moyenne. L'erreur maximale ($2 \sigma_{\text{max}}$) vaut, quant à elle, 85% de la concentration moyenne. Par contre, ces

pourcentages diminuent lorsque la concentration augmente. Ils ne valent plus que, respectivement 11% et 20% pour une concentration moyenne de $47,8 \mu\text{g L}^{-1}$.

D'où ce bruit expérimental relativement important peut-il provenir ? D'après la littérature technique, les problèmes peuvent provenir de diverses origines :

a) Problèmes dus aux molécules fluorescentes

- Si le spectre d'émission des molécules fluorescentes a une partie commune avec leur spectre d'excitation, les molécules peuvent s'auto-exciter (« self quenching »). L'étude réalisée par Chan *et al.* (2002) semble montrer que dans le cas de la rhodamine 6G, la gamme de longueurs d'onde communes à l'excitation et la réémission des molécules correspond à des énergies très faibles. Cette molécule ne semble donc pas présenter de problème de « self quenching ».
- Si les molécules sont soumises à une puissance lumineuse importante, elles peuvent être dégradées (« photobleaching »). La vitesse de décroissance du nombre de molécules lumineuses semble suivre une loi du premier ordre. Le déplacement des molécules de rhodamine dans l'écoulement a un effet sur ce « photobleaching » : plus la vitesse est élevée et moins les particules auront tendance à subir du « photobleaching ». La publication de Crimaldi (1997), réalisée avec un laser focalisé sur un petit volume de solution, semble montrer que les molécules de rhodamine 6G ne souffrent pas de « photobleaching ». Dans le présent travail, le laser émet dans un plan relativement grand, ce qui atténue encore la puissance reçue par chaque particule.

b) Problèmes dus aux lasers

- La distribution spatiale de l'énergie émise par le laser n'est pas homogène. En effet, le faisceau plan étant créé à partir d'une source ponctuelle à l'aide d'une optique, l'intensité du laser n'est pas uniformément répartie dans l'espace dans la direction perpendiculaire au faisceau original. De plus, les molécules de rhodamine qui sont les plus proches du laser absorbent une partie des photons. L'intensité lumineuse reçue par les molécules de rhodamine est donc d'autant plus faible que ces particules sont éloignées de la source lumineuse. L'utilisation d'une courbe de calibration relative à chacun des pixels de l'image acquise par la caméra permet de tenir compte de ce phénomène.
- L'énergie du laser fluctue d'un pulse à l'autre. Il est possible d'en tenir compte en corrigeant les images sur base d'une mesure de l'énergie instantanée du laser. L'énergie instantanée du laser est mesurée à l'aide d'une photodiode installée entre la tête du laser et le dispositif optique.

c) Problèmes dus aux caméras

- L'optique des caméras peut introduire des déformations mais, en théorie, celles-ci restent constantes et sont donc prises en compte par les courbes de calibration relatives à tous les pixels.
- L'électronique des caméras peut introduire du bruit qui peut varier d'un pulse à l'autre et à l'intérieur de l'image. Ce bruit peut être réduit lorsque la lumière émise par les molécules de rhodamine est moyennée sur des groupes de pixels. Ce regroupement de pixels s'appelle du « pixel binning » et est directement implémenté dans le réglage de la caméra. Ce traitement permet de réduire le bruit mais diminue aussi la résolution spatiale des

mesures. Un compromis doit donc être trouvé. Dans ce travail, nous avons regroupé les pixels par 4 (carrés de 2 pixels de côté).

Nous avons pris en compte tous ces problèmes et tenté de les éliminer en sélectionnant une molécule fluorescente stable et adaptée à notre dispositif, en optimisant sa gamme de concentration, en éliminant les réflexions lumineuses parasites, en optimisant la position du laser par rapport à la cuve, en établissant une courbe de calibration pixel par pixel, en employant une photodiode qui mesure l'énergie du laser à chaque pulse, en optimisant les paramètres de la caméra (netteté, ouverture, utilisation d'un filtre) et en limitant son bruit par le regroupement de pixels. Malgré ces nombreux efforts, l'erreur expérimentale reste importante.

Nous suspectons que cette erreur expérimentale importante provient des fluctuations non contrôlées au niveau de la distribution spatiale de l'intensité lumineuse dans le plan émis par le laser. En effet, cette intensité lumineuse fluctue d'un pulse à l'autre, non seulement en valeur moyenne, mais également au niveau de sa distribution spatiale. Afin de mettre ces fluctuations en évidence, une série d'images a été mesurée dans un plan de la cuve remplie d'une solution de concentration uniforme en rhodamine 6G. Les fluctuations ont été quantifiées en extrayant les niveaux de gris le long d'une ligne verticale de l'image (ligne jaune sur la Figure IV-14 de droite) et en calculant le coefficient de corrélation entre les courbes obtenues pour des images qui se suivent (exemple à la Figure IV-14 gauche). Les coefficients de corrélation calculés sur toute la série d'images sont compris entre 0.11 et 0.35. Ces valeurs très faibles indiquent clairement que la distribution des niveaux de gris mesurés varie de manière importante d'une image à l'autre (Figure IV-14) et donc d'un pulse à l'autre.

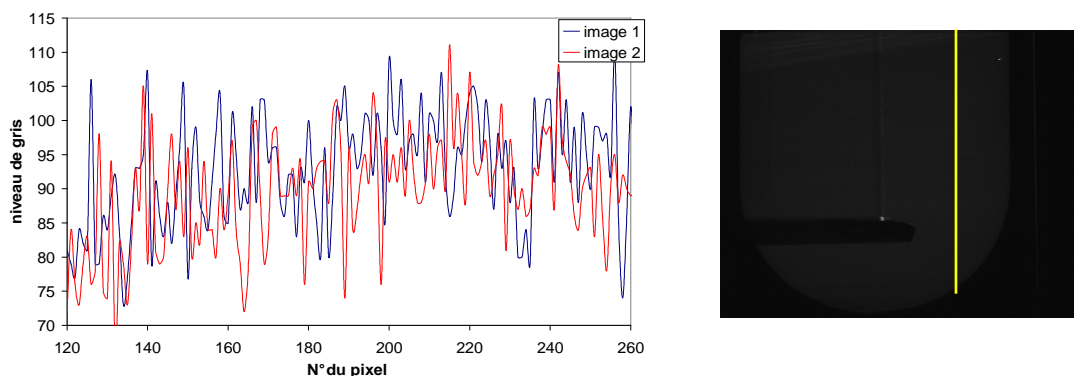


Figure IV-14 : Mise en évidence de la variation de la répartition spatiale des niveaux de gris d'une image à l'autre. Les profils extraits correspondent aux niveaux de gris des pixels situés le long de la ligne jaune.

Ces fluctuations non contrôlées auront un impact sur la précision et la qualité des courbes de calibration et également sur le résultat final obtenu lorsqu'une image est convertie en champ instantané de concentration.

Nous avons tenté de prendre en compte l'erreur introduite dans l'analyse des résultats qui sera présentée dans la section suivante. Cependant cette analyse devra être vue comme une étude semi-quantitative permettant de mettre en évidence certaines tendances, plutôt que comme une étude quantitative permettant la validation directe de champs de concentration théoriques, simulés par CFD, par exemple.

Il est important d'avoir conscience de la seconde limitation de la technique P.L.I.F. afin d'interpréter correctement les résultats. Etant donné que la technique P.L.I.F. permet de mesurer le champ de concentration uniquement dans un plan à la fois, ce qui est observé *in fine*, vu le mode opératoire utilisé, sont des tranches du nuage de rhodamine qui, au cours du temps, traverse le plan mais qui également, au cours du temps, évolue selon les mécanismes cités dans la section précédente. Ainsi, chaque image correspond à une tranche donnée du nuage (par exemple, une tranche qui passe à la périphérie du nuage ou en son centre) à un temps donné auquel correspondra un état donné du mélange. La conséquence de cela est qu'on ne mesure pas une information dans l'ensemble du nuage mais seulement dans une de ses tranches. Ainsi, par exemple lorsqu'on calcule la concentration maximale observée dans une image, ce qu'on détermine c'est la concentration maximale observée dans la tranche du nuage au temps t et non la concentration maximale observée dans l'ensemble du nuage au temps t . Cette limitation de la technique entraîne certes une perte d'informations. Cependant la démarche reste pertinente vis-à-vis de la question posée concernant le risque d'hétérogénéité dans le bioréacteur vu les faibles vitesses de rotation employées car elle permet une description locale des champs de concentration et elle donne une information nettement plus détaillée que la mesure d'un simple temps de mélange.

3.2.3 Description quantitative

Les mesures P.L.I.F. permettent de caractériser l'évolution spatio-temporelle des hétérogénéités de concentration qui apparaissent après l'injection d'une solution traçante. Le but de ces expériences est de répondre à la question : « Ces hétérogénéités sont-elles suffisamment importantes, en valeur absolue et en étendue, et subsistent-elles pendant un temps suffisamment long que pour avoir un impact significatif sur les performances d'une culture de cellules animales ? »

L'analyse quantitative des champs de concentration est orientée dans ce sens et leur analyse a plus particulièrement porté sur :

- L'évolution temporelle de la concentration maximale observée dans chaque plan de mesure ;
- L'évolution temporelle de la fraction de la surface de chaque plan, dans laquelle la concentration reste supérieure à un seuil défini *a priori*.

Ces deux grandeurs, concentration maximale et fraction de surface, sont naturellement extraites de chaque champ de concentration obtenu à partir des images brutes traitées selon les opérations décrites au Point 3.1.3. Leur évolution au cours du temps est ensuite analysée. Afin de pouvoir comparer les résultats d'un plan à l'autre, résultant de l'injection de solution de traceur de concentrations différentes, les valeurs de concentration obtenues sont normées par la concentration de la solution injectée. De plus, pour l'analyse de l'évolution temporelle de la concentration maximale, un traitement supplémentaire est appliqué afin de tenir compte du bruit qui entache les mesures. Il faut que la valeur maximale de concentration, C_{max} , obtenue dans le champ respecte la condition suivante :

$$C_{max} - 2\sigma_{max, C_{max}} > C_{fond} + 2\sigma_{max, C_{fond}} \quad (IV-4)$$

où C_{fond} est la concentration moyenne en rhodamine 6G mesurée dans la cuve avant injection de la solution traçante et σ est la valeur maximale de la distribution d'écart-type observé établie lors de l'étude du bruit expérimental. Cette condition impose donc que la concentration maximale mesurée à laquelle on retire le bruit maximal observé pour ce niveau de concentration soit supérieure à la concentration moyenne avant injection à laquelle on ajoute le bruit maximal observé à ce niveau de concentration. La Figure IV-15 présente l'évolution temporelle de la concentration maximale observée dans chaque plan de mesure pour différentes vitesses de rotation. Sur les graphiques présentés, il apparaît, qu'en raison de l'importance du bruit qui entache les mesures, il n'est pas possible de suivre l'évolution de la concentration maximale jusqu'à la fin du processus de mélange. Seules les valeurs de C_{max} mesurées durant les premières secondes peuvent être exploitées. Notons cependant qu'il est tout à fait possible de caractériser la fin du processus de mélange par la technique P.L.I.F. pour déterminer, par exemple, un temps de mélange. Cela nécessite par contre une modification complète du protocole d'acquisition des mesures pour que la concentration dans le plan de mesure soit comprise, lors des derniers instants du mélange, dans la gamme 0 - 60 $\mu\text{g L}^{-1}$. Le protocole ainsi que les résultats de temps de mélange sont présentés dans l'Annexe IV-1 de ce chapitre pour le lecteur intéressé. Notons que les temps de mélange ainsi obtenus concordent bien avec ceux obtenus par conductimétrie. Cette approche présente l'avantage d'établir des temps de mélange sur base de données acquises en de nombreux points contrairement à la conductimétrie où les données correspondent à un seul point du bioréacteur. Elle présente par contre l'inconvénient d'être assez contraignante à l'emploi (nombreuses vidanges de cuve, réglage délicat des appareils...).

Les graphiques présentés à la Figure IV-15 ont tous la même allure. Durant une première phase qui dure à peu près 1 s et qui correspond à la durée de l'injection de la solution traçante dans la cuve, la concentration maximale fluctue autour d'une valeur quasi constante, de l'ordre de 20 à 35 % de la concentration de la solution injectée. Durant une seconde phase, la valeur maximale de la concentration dans les plans décroît rapidement au cours du temps suivant une loi en puissance (courbe grise dans les graphiques de la Figure IV-15). Sur chacun des graphiques, les points relatifs aux différents plans de mesure qui correspondent donc à des avancements différents du processus de mélange se succèdent de manière logique.

Les observations qualitatives présentées dans la section précédente sont donc confirmées par l'analyse des graphiques de la Figure IV-15.

Premièrement, on constate effectivement que la concentration maximale observée lors de l'injection de la solution traçante est indépendante du type de mobile utilisée et de la vitesse de rotation. Elle est donc indépendante des conditions hydrodynamiques au sein du bioréacteur et dépend uniquement des conditions d'injection qui sont ici constantes.

Deuxièmement, on observe bien la dépendance de la seconde phase de mélange vis-à-vis des conditions hydrodynamiques. Insistons de nouveau sur le fait que la concentration maximale obtenue est celle mesurée dans une tranche du nuage de rhodamine à un instant donné et non la valeur maximale dans l'ensemble du nuage à cet instant donné. Cet aspect est essentiel pour interpréter correctement les résultats car la valeur obtenue à chaque instant résulte de

deux mécanismes antagonistes : d'une part, les mécanismes de mélange qui réduisent la concentration en chaque point du nuage au cours du temps et d'autre part, le fait que le nuage traverse le plan au cours du temps et que les tranches successives correspondent donc d'abord à la périphérie du nuage, ensuite à son cœur qui est plus concentré et enfin de nouveau à la périphérie. Manifestement, au début du mélange, le second effet l'emporte sur le premier car on constate que les points correspondant aux plans 2 et 3 passent par un maximum dans les graphiques de la Figure IV-15.

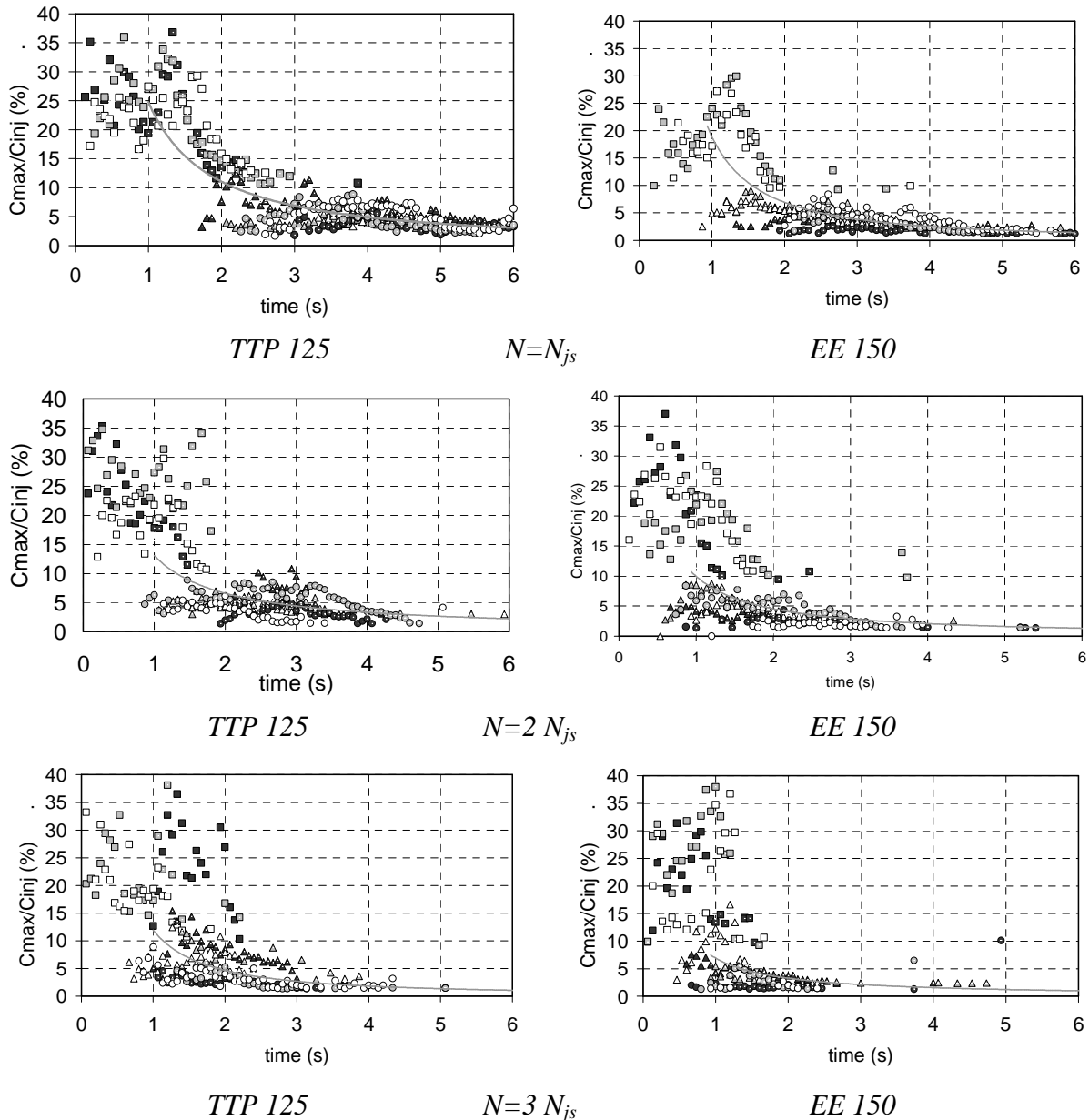


Figure IV-15 : Evolution temporelle de la concentration maximale observée dans les 3 plans de mesure normée par la concentration de la solution injectée (plan 1 : ■■□, plan 2 : ▲▲Δ, plan 3 : ●●○). Les concentrations sont normées par la concentration de la solution injectée. Les résultats sont présentés pour les deux mobiles à des multiples de leur vitesse de rotation minimale de maintien des microporteurs en suspension complète.

Les graphiques de la Figure IV-15 permettent également de mettre en évidence les effets de la vitesse de rotation et du type de mobile sur l'évolution temporelle de la concentration

maximale dans chaque plan. D'après le modèle de Baldyga et Pohorecki et compte-tenu des résultats obtenus dans le chapitre précédent, la vitesse de rotation du mobile doit avoir deux effets sur le processus de mélange :

- Une augmentation de la vitesse de rotation entraîne une augmentation de la vitesse moyenne en chaque point du bioréacteur. Les composantes axiale et tangentielle de la vitesse moyenne augmentent donc. Dès lors, le nuage doit s'approcher plus rapidement de la zone balayée par le mobile et également quitter d'autant plus vite le plan 1 et rentrer d'autant plus vite dans les plans 2 et 3 que la vitesse de rotation du mobile augmente ;
- Une augmentation de vitesse de rotation entraîne également une augmentation en tout point du bioréacteur des grandeurs caractéristiques de la turbulence augmentant l'efficacité des mécanismes de mésomélange et micro-mélange par incorporation.

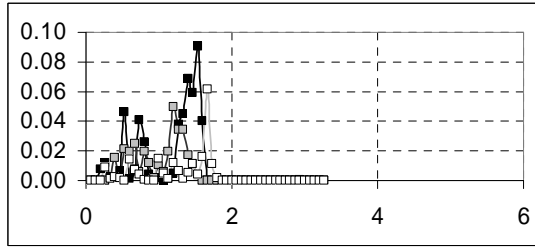
Ces deux raisonnements semblent être validés par les graphiques de la Figure IV-15 où on observe une incurvation de plus en plus marquée de la courbe et l'apparition de plus en plus précoce des premiers résultats dans les plans 2 et 3 avec l'augmentation de la vitesse de rotation du mobile.

Aux chapitres précédents, nous avons constaté que, lorsque les mobiles sont comparés à leur vitesse de rotation N_{js} respective, ils génèrent des distributions similaires pour toutes les grandeurs hydrodynamiques excepté la composante tangentielle de la vitesse moyenne qui est deux fois plus grande pour le mobile EE 150. On en déduit que le type de mobile, employé dans ce cas, doit avoir seulement un effet sur la vitesse à laquelle le nuage traverse les différents plans. Cet effet s'observe aisément lorsque l'on compare les courbes obtenues dans la Figure IV-15 : les premiers résultats dans les plans 2 et 3 apparaissent dans les graphiques relatifs au mobile EE 150 à des temps quasi deux fois plus courts. Les courbes en gris, qui correspondent aux lois de puissance ajustées sur tous les points expérimentaux excepté ceux correspondant à l'injection, ont par contre des allures similaires.

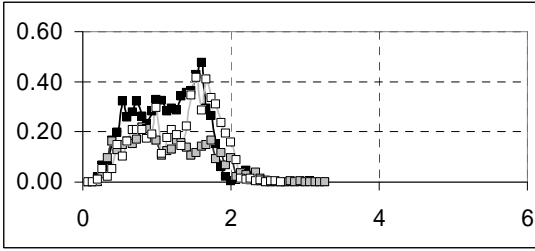
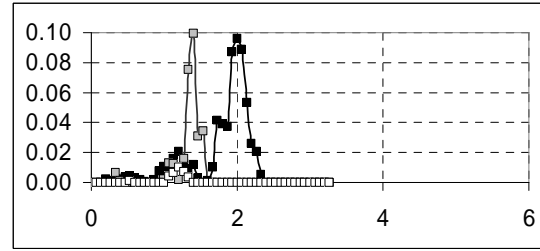
La seconde grandeur dont on peut suivre l'évolution temporelle est la fraction de surface du plan de mesure dans laquelle la concentration est supérieure à une valeur limite définie *a priori*. Cette analyse permet de quantifier la fraction de volume de la cuve où une concentration excessive peut être observée. Ici encore, afin de s'affranchir du bruit qui entache les mesures, seules les concentrations supérieures à un seuil minimal sont prises en compte. Ce seuil a été fixé à $5 \mu\text{g L}^{-1}$, ce qui correspond, respectivement, à 5 %, 1.25 % et 0.625 % de la concentration injectée pour les mesures dans les plans 1, 2 et 3.

Les évolutions temporelles des fractions de surface des plans dont la concentration est supérieure à une valeur limite définie *a priori* sont présentées à la Figure IV-16. Les concentrations limites fixées sont respectivement égales à 20% et 10% de la concentration injectée pour les mesures dans le plan 1, à 5% et 2% de la concentration injectée pour les mesures dans le plan 2 et à 2% et 1% de la concentration injectée pour les mesures dans le plan 3. Comme le montrent les graphiques de la Figure IV-16, les résultats obtenus varient fortement d'une injection à l'autre car ils sont très sensibles au bruit expérimental. Il ne sera donc pas possible d'étudier l'influence de la vitesse de rotation ou du type de mobile. Nous nous contenterons de calculer des valeurs approximatives dans le cas le plus défavorable du

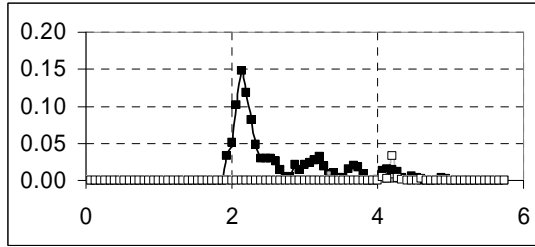
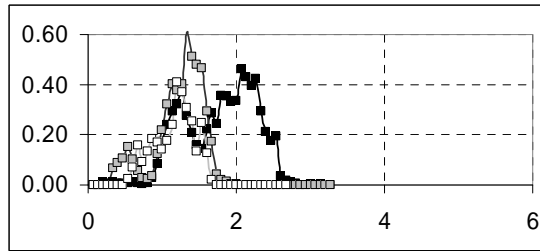
point de vue mélange, c'est-à-dire pour les essais réalisés pour chaque mobile à sa vitesse de rotation minimale pour maintenir les microporteurs en suspension (N_{js}).



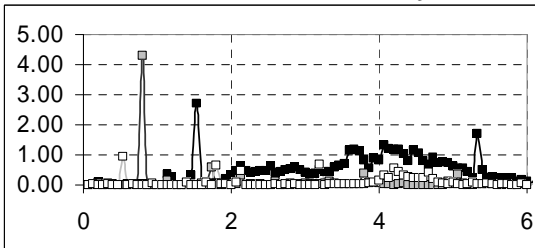
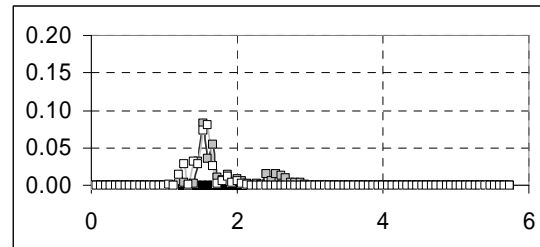
Plan 1 : Concentration seuil = 20 % Cinj



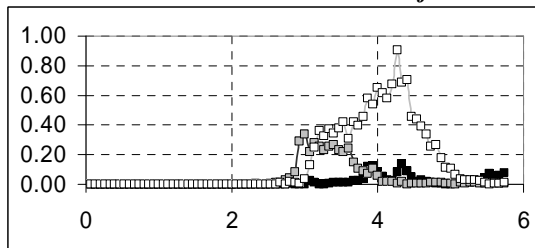
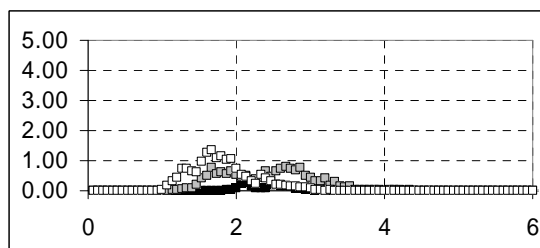
Plan 1 : Concentration seuil = 10 % Cinj



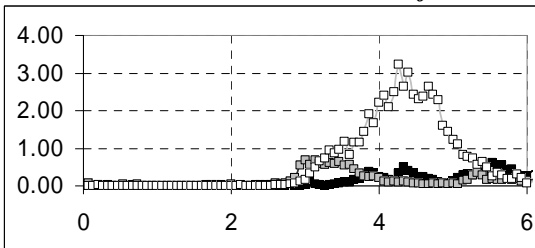
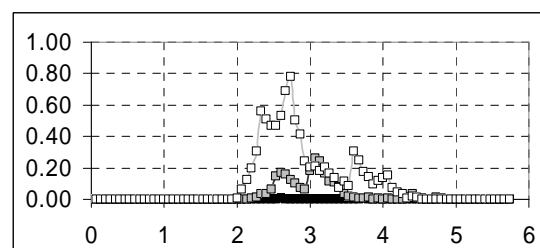
Plan 2 : Concentration seuil = 5 % Cinj



Plan 2 : Concentration seuil = 2 % Cinj



Plan 3 : Concentration seuil = 2 % Cinj



Plan 3 : Concentration seuil = 1 % Cinj

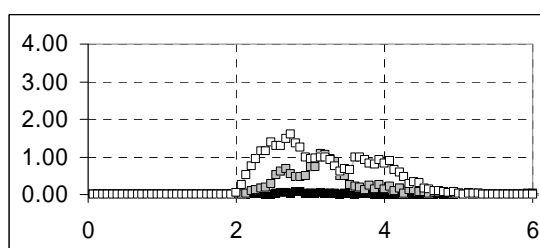


Figure IV-16 : Evolution temporelle de la fraction de surface du plan (%) caractérisée par une concentration supérieure à un seuil donné exprimé en % de la concentration de la solution injectée. Colonne de gauche : Mobile TTP 125 à N_{js} (50rpm), Colonne de droite : Mobile EE 150 à N_{js} (20 rpm).

Les évolutions temporelles des fractions de surface de plan dont la concentration est supérieure à une valeur limite ont, pour la plupart, une allure en forme de cloche. Cette allure résulte de nouveau de la manière dont les mesures sont réalisées et des effets antagonistes du mélange : le plan de mesure est traversé par le nuage, qui est plus concentré en son cœur qu'à sa périphérie, alors que le mélange tend à homogénéiser la solution et donc à réduire la fraction de volume de liquide caractérisée par des concentrations élevées. La fraction de surface du plan où la concentration est supérieure à une valeur limite augmente donc dans un premier temps, car dans un plan donné, le cœur du nuage, plus concentré, commence par se rapprocher. Cette fraction diminue ensuite du fait du mélange et de l'éloignement progressif du cœur du nuage. Même pour les mesures correspondant au cœur du nuage, les fractions de surface des plans caractérisées par les valeurs de concentration supérieures aux valeurs limites choisies sont très petites. Cette fraction de surface est inférieure à 0.1 % et 0.6 % dans le plan 1 lorsque le seuil de concentration est respectivement proche de la concentration maximale mesurée lors l'injection ($C=35\%$ de $C_{\text{injecté}}$) ou la moitié de celle-ci. Dans les autres plans, elle vaut seulement quelques pourcents pour des seuils de concentration faibles égaux à 1 ou 2% de $C_{\text{injecté}}$. Même si ce résultat correspond à des concentrations mesurées à un instant donné dans une seule tranche du nuage, on peut raisonnablement l'extrapoler à l'ensemble du volume de la cuve et dire ainsi que le pourcentage du volume de la cuve où la concentration est supérieure à une valeur limite fixée *a priori* reste très faible lors de l'injection d'une solution traçante.

4 Discussion des résultats en relation avec les données disponibles sur le métabolisme des cellules animales

Les résultats obtenus dans les deux premières parties de ce chapitre montrent que, d'un point de vue temporel, le mélange au sein du bioréacteur est caractérisé par des temps de mélange de l'ordre de 20 s pour le mobile TTP 125 et de 30 s pour le mobile EE 150 lorsqu'ils tournent respectivement à leur vitesse de rotation N_{js} qui maintient les microporteurs en suspension complète dans la cuve de 20 L. Ce temps de mélange diminue de manière inversement proportionnelle avec la vitesse de rotation. Du point de vue spatial, les gradients de concentration qui résultent de l'injection de quelques mL d'une solution de rhodamine occupent une fraction de la surface des plans de mesure qui reste très faible, de l'ordre de quelques pourcents au maximum. A l'instant initial, les concentrations maximales mesurées sont de l'ordre de 25 à 30% de la concentration de la solution injectée et ne dépendent que des conditions d'injection. Ensuite, ces valeurs de concentration maximale diminuent rapidement au cours du temps suivant une loi de puissance dont l'allure est fonction des conditions d'agitation.

Pour déterminer si le mélange peut avoir un impact sur le métabolisme des cellules animales, nous appliquerons l'approche généralement employée en génie chimique, qui consiste à comparer les temps caractéristiques des différents processus mis en jeux. Deux situations peuvent être rencontrées :

- Soit $t_{\text{mélange}} < t_{\text{métabolisme cellulaire}}$, dans ce cas, l'homogénéité de la solution est obtenue avant qu'il n'y ait modification du métabolisme des cellules. L'effet du mélange sur le métabolisme cellulaire peut être considéré comme négligeable ;
- Soit $t_{\text{mélange}} \geq t_{\text{métabolisme cellulaire}}$, dans ce cas, les cellules animales perçoivent la modification de composition locale du milieu et ont le temps de s'adapter à ces nouvelles conditions. L'effet du mélange n'est pas négligeable et doit être pris en compte.

Si on compare les temps de mélange mesurés aux temps caractéristiques relatifs à la croissance des cellules ou à la consommation des réactifs, il apparaît clairement que nous sommes dans la première situation. En effet, les temps caractéristiques de croissance et de consommation peuvent être estimés par les relations :

$$T_{\text{croissance}} = \frac{1}{\mu_{\text{max}}}, T_{\text{consommation}} = \frac{S}{q_{s,\text{max}} X} \quad (IV-5)$$

où μ_{max} est la vitesse spécifique maximale de croissance, S est la concentration en substrat, $q_{s,\text{max}}$ est la vitesse spécifique maximale d'assimilation du substrat et X est la concentration cellulaire. Si on se base sur les ordres de grandeur des données cinétiques présentées dans la revue écrite par Portner (2009), on obtient des temps caractéristiques de croissance compris entre 8h et 30h suivant les conditions de culture et des temps caractéristiques de consommation du glucose de l'ordre de 10h ($S \approx 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, $X \approx 10^9 \text{ cellules L}^{-1}$ et $q_{s,\text{max}} \approx 10^{-13} \text{ mol cellules}^{-1}\text{h}^{-1}$).

Divers auteurs (Langheinrich *et al.*, 1998 ; Nienow *et al.*, 1996) avancent que la deuxième situation pourrait être rencontrée lorsque de la soude est injectée à la surface du bioréacteur pour réguler le pH, en particulier lorsque les bioréacteurs sont de grande taille. D'après eux, la diminution de productivité observée dans ces bioréacteurs proviendrait d'un défaut de mélange dû au choix de conditions d'agitation douces pour limiter les contraintes mécaniques. Conceptuellement, on pourrait facilement imaginer que les cellules qui se trouvent dans le nuage de soude au moment où il est injecté et au début de sa dispersion subissent un saut de pH brusque et important, ce qui entraînerait leur mort. Néanmoins, les phénomènes en jeu sont plus complexes comme le montrent les travaux d'Osman *et al.* (2001, 2002) qui ont tenté de mesurer la réponse de cellules animales à des variations brusques de pH. Les cellules employées dans cette étude sont des cellules de myélome de souris (GS-NSO). Leur pH optimal de culture est de 7.3. Deux types d'expérience sont menés dans des bioréacteurs de 2 L après 48h d'incubation.

Dans le premier type d'expérience, le pH du bioréacteur passe brutalement d'une valeur de 7.3 à une valeur choisie. Cette valeur est maintenue jusqu'à la fin de la culture. Six essais sont réalisés à des pH de 6.5, 7.0, 7.5, 8.0, 8.5 et 9.0. Des échantillons sont prélevés dans le bioréacteur après différents intervalles de temps compris entre 0 et 600 min après le saut de pH afin de suivre l'évolution temporelle du nombre de cellules viables et de la proportion de cellules qui sont dans un état de mort programmée ou dans un état de nécrose. Cette première expérience met en évidence deux éléments importants :

- Le pH doit atteindre la valeur minimale de 8.5 pour observer une augmentation au cours du temps de la proportion de cellules en état de mort programmée. Il doit atteindre la valeur 9.0 pour observer une augmentation importante de la proportion de cellules nécrosées. Des variations de pH comprises entre 7.0 et 8.0 semblent être compensées par le métabolisme cellulaire : après le changement de pH, la proportion de cellules en état de mort programmée augmente très légèrement pour ensuite revenir à la valeur correspondant au pH optimal bien que le pH soit maintenu à une valeur différente.
- Aux pH 8.5 et 9.0, la mort cellulaire n'est pas instantanée. Il reste 85% de cellules vivantes après 10 min d'exposition à un pH 9.0. Après 90 min, 15% des cellules sont encore vivantes. Ces délais sont plus longs à pH 8.5. Par exemple, 35% des cellules sont encore vivantes après 600 minutes d'exposition.

Dans le second type d'expérience, les cellules sont soumises périodiquement à un saut de pH. Pour se faire, la cuve de 2 L est connectée à une cuve de 1 L par une pompe péristaltique. La soude est brutalement injectée dans cette petite cuve pour y faire augmenter le pH tandis que le pH dans la cuve de 2 L est maintenu à sa valeur optimale de 7.3 par addition de d'acide chlorhydrique. Les profils de pH mesurés dans la petite cuve sont présentés à la Figure IV-17. Il est possible d'ajuster la durée et l'amplitude du saut de pH en jouant sur les paramètres opératoires. Des pics de pH de 200 s sont répétés avec une périodicité choisie entre 6 min et 60 min. Des échantillons sont de nouveau prélevés à intervalles de temps réguliers pour estimer l'évolution temporelle du nombre de cellules vivantes. Au vu des paramètres opératoires, les auteurs estiment qu'environ 30% des cellules présentent dans le bioréacteur subissent le saut de pH à chaque saut. Ce second type d'expérience met en évidence un phénomène important supplémentaire : la sensibilité des cellules au saut de pH dépendrait du nombre de fois qu'elles subissent le phénomène et de la fréquence à laquelle elles le subissent. En effet, dans les expériences précédentes, où le pH était maintenu pendant 600 min à une valeur de 8.0, aucune mort cellulaire n'était observée alors qu'une décroissance d'environ 27.5 % du nombre de cellules vivantes est mesurée après 100 sauts de pH à un pH 8.0 avec une périodicité de 6 min.

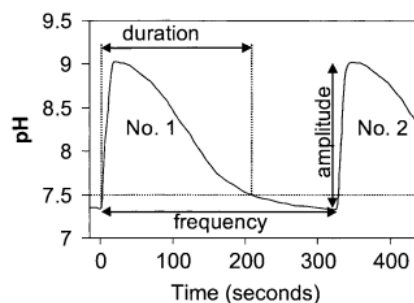


Figure IV-17 : Profils de pH mesurés dans la cuve de 1 L où sont réalisées les injections de soude (Osman et al, 2002)

Si ces résultats sont combinés aux valeurs de temps de mélange mesurées dans la présente étude, il apparaît que la réponse à la question : « Le gradient de concentration résultant de l'injection de soude pour réguler le pH peut-il avoir un impact sur le métabolisme cellulaire? » est très probablement négative car :

- Les mesures P.L.I.F. montrent que, même si on injecte une solution concentrée dans la cuve, les concentrations mesurées dans la cuve chutent extrêmement vite et les zones concernées par des surconcentrations même modérées représentent une faible fraction du volume du bioréacteur. Dès lors, très peu de cellules subissent ces sauts de concentration.
- De plus, le faible nombre de cellules concernées par des sauts de concentration subissent ces surconcentrations pendant des intervalles de temps nettement plus courts que ceux nécessaires pour générer une réponse cellulaire (Osman *et al.* 2001, 2002).

En conclusion, il apparaît donc que, dans la gamme des conditions opératoires étudiées, les caractéristiques temporelles et spatiales du mélange dans le bioréacteur de 20 L sont telles qu'elles n'auront pas d'effet sur le métabolisme cellulaire. C'est la raison pour laquelle, dans la suite de ce travail, les champs de concentration seront supposés constants et uniformes au sein de la cuve agitée.

Annexe IV-1 : Détermination de temps de mélange *via* la technique P.L.I.F.

Pour caractériser la fin du mécanisme de mélange et déterminer par exemple un temps de mélange par des mesures P.L.I.F., il faut adapter le protocole d'expérience afin d'obtenir, durant les derniers instants du mécanisme de mélange, une concentration dans le plan de mesure comprise dans la gamme linéaire 0 - 60 $\mu\text{g L}^{-1}$. Il faut donc injecter dans la cuve une solution très concentrée. Nous avons choisi d'injecter 1.25 mL d'une solution de 160 mg L^{-1} et d'enregistrer les images acquises par les caméras à une fréquence de 4 Hz. Les images sont ensuite traitées selon les étapes suivantes afin d'obtenir, pour chaque image, l'écart type de niveaux de gris mesuré dans une zone définie :

- L'image est chargée dans l'environnement Matlab[®] (version R2010a)
- Les niveaux de gris des pixels dans une zone d'intérêt correspondant à la moitié droite de la cuve sont sélectionnés.
- Ces niveaux de gris sont corrigés selon la formule suivante :

$$G_{\text{corrigé}}(x, y, t) = \frac{G(x, y, t) - G(x, y, \text{avant_injection})}{G(x, y, \text{après_homogénéisation}) - G(x, y, \text{avant_injection})} * \frac{G(\text{moyen_dans_image}, t) - G(\text{moyen_dans_image}, \text{avant_injection})}{G(\text{moyen_image}, \text{après_homogénéisation}) - G(\text{moyen_image}, \text{avant_injection})} \quad (\text{IV-6})$$

où le premier terme permet d'obtenir une valeur comprise entre 0 et 1. Le second terme permet de tenir compte des fluctuations de l'énergie du laser d'un pulse à l'autre.

- Pour chaque image, la moyenne et la variance de la distribution des valeurs $G_{\text{corrigé}}$ sont calculées pour la zone d'intérêt.

Pour déterminer le temps de mélange à 95%, la courbe $\frac{\sqrt{\text{variance}}}{\text{moyenne}}$ est ensuite tracée en fonction du temps. Sur cette courbe, le temps correspondant à la valeur $\frac{\sqrt{\text{variance}}}{\text{moyenne}} = 5\%$ est le temps de mélange $t_m^{95\%}$.

Deux exemples de courbes obtenues avec le mobile TTP 125 qui tournent respectivement aux vitesses 60 et 170 rpm sont présentés dans les Figure IV-18 et Figure IV-19. Les résultats obtenus sont en bon accord avec ceux mesurés par conductimétrie. En effet, on obtient sur base des mesures P.L.I.F., un temps de mélange de respectivement 24.75 s et 10.25 s aux vitesses de rotation 60 rpm et 170 rpm. A ces vitesses de rotation, la corrélation de Greenville, établie sur base des mesures conductimétriques, prédit des valeurs de 24.2 s et 8.55 s.

Il faut noter que dans ce type de mesure, aucune calibration n'est nécessaire. La concentration en rhodamine 6G dans la cuve après l'homogénéisation a augmenté de 10 $\mu\text{g L}^{-1}$. Une deuxième injection est encore possible mais l'écart-type à la fin du processus de mélange a tendance à rester dans une gamme de valeurs proche de la valeur critique des 5%. Si une troisième injection est réalisée, l'écart-type ne descend plus en dessous des 5%. Il faut

donc vidanger la cuve et la remplir à nouveau pour mesurer des temps de mélange dans d'autres conditions.

Dès lors, bien que cette approche présente l'avantage d'établir des temps de mélange sur base de données acquises en de nombreux points contrairement à la conductimétrie où les données correspondent à un seul point du bioréacteur, elle présente l'inconvénient d'être assez contraignante à l'emploi car il faut vidanger la cuve toutes les deux injections.

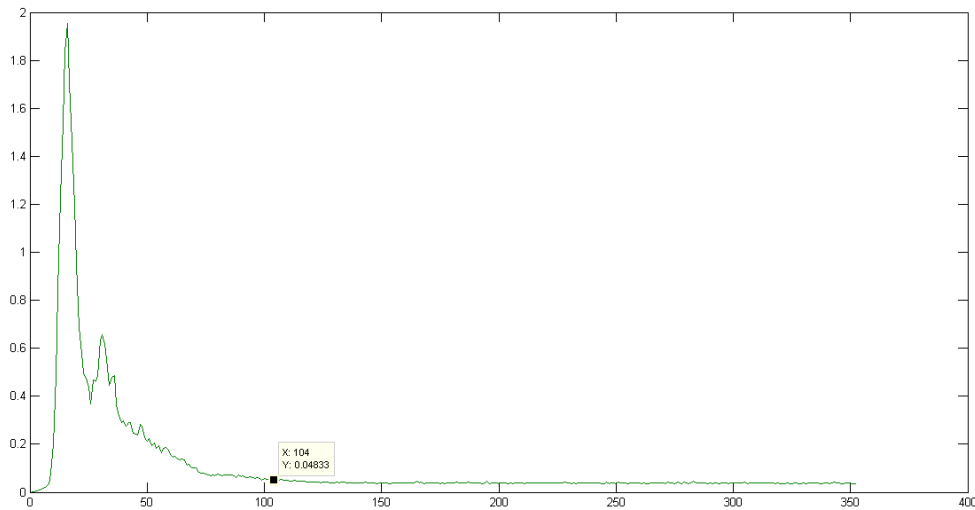


Figure IV-18 : Evolution de la $\sqrt{\text{variance}}/\text{moyenne des niveaux de gris corrigés}$ en fonction du numéro de l'image lorsque le mobile TTP 125 tourne à la vitesse de 60 rpm. La valeur inférieure à 0.05 est atteinte à l'image 104 qui correspond à un temps de 24.75 s.

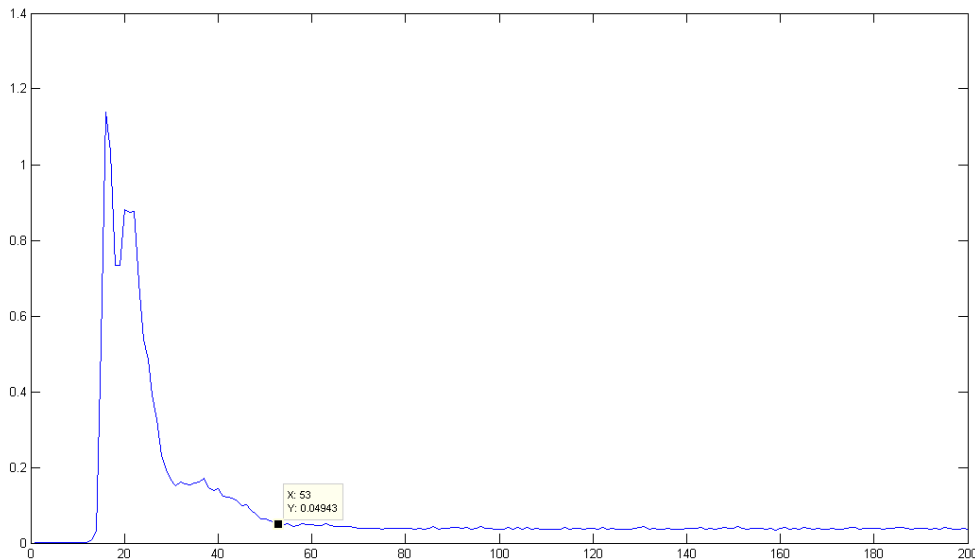


Figure IV-19 : Evolution de la $\sqrt{\text{variance}}/\text{moyenne des niveaux de gris corrigés}$ en fonction du numéro de l'image lorsque le mobile TTP 125 tourne à la vitesse de 170 rpm. La valeur inférieure à 0.05 est atteinte à l'image 53 qui correspond à un temps de 10.25 s.

Liste des symboles

EE 150	Mobile axial de modèle « Elephant Ear » (Applikon) diamètre d=150 mm	
P.L.I.F.	Planar Laser Induced Fluorescence	
TTP 125	Mobile axial de modèle TTP (Mixel) et de diamètre d=125 mm	
TTP 150	Mobile axial de modèle TTP (Mixel) et de diamètre d=150 mm	
A	Constante de la corrélation de Greenville <i>et al.</i> (1995)	[-]
A_c	Coefficient d'absorbance des molécules de rhodamine	[-]
C	Concentration locale en rhodamine 6G	[$\mu\text{g L}^{-1}$]
$C_{critique}$	Concentration au-delà de laquelle la proportionnalité n'est plus observée entre fluorescence émise et concentration des molécules de rhodamine 6G	
C_{fond}	Concentration homogène observée dans la cuve avant injection de la solution traçante	[$\mu\text{g L}^{-1}$]
C_{max}	Concentration maximale observée dans le plan de mesure	[$\mu\text{g L}^{-1}$]
d	Diamètre du mobile	[m]
E	Energie fournie par le laser	[J]
f_{optic}	Constante rassemblant les paramètres optiques lors des mesures P.L.I.F.	
F	Intensité de la fluorescence émise par les molécules de rhodamines	
G	Niveau de gris dans les images brutes	[-]
N	Vitesse de rotation du mobile	[rpm]
N_{js}	Vitesse de rotation minimale de maintien en suspension	[rpm]
N_p	Nombre de puissance	[-]
T	Diamètre de la cuve	[m]
t^M	Temps de mélange	[s]
α_c	Coefficient de proportionnalité entre la fluorescence émise par des molécules de rhodamine et leur concentration pour un niveau d'énergie donné.	
σ	Ecart type de concentration observé dans l'ensemble du plan pour un niveau de concentration donné.	[$\mu\text{g L}^{-1}$]

Table des figures

<i>Figure IV-1 : Localisation du point d'injection de la solution de NaCl et de la position de la sonde conductimétrique lorsque la cuve est vue du haut.....</i>	<i>182</i>
<i>Figure IV-2 : Sonde de conductimétrie « maison ».....</i>	<i>182</i>
<i>Figure IV-3 : Temps de mélange expérimentaux mesurés par conductimétrie dans des cuves agitées respectivement par les mobiles TTP 125 ($d/T=0.4$, ■, □) TTP 150 ($d/T=0.5$, ○, ●, ●) Les courbes correspondent à la corrélation de Greenville où le paramètre A vaut resp. 3.67 et 3.34.....</i>	<i>184</i>
<i>Figure IV-4 : Temps de mélange expérimentaux mesurés par conductimétrie dans des cuves agitées respectivement par le mobiles EE 150 ($d/T=0.5$, ○, ●, ●) La courbe correspond à la corrélation de Greenville où le paramètre A déterminé par ajustement par la méthode des moindres carrés vaut 2.95.....</i>	<i>184</i>
<i>Figure IV-5 : Position relative du point d'injection et des sondes conductimétriques lors de l'étude des temps de mélange réalisée par Greenville et al. (1995). Images extraites de la publication de Houcine et al. (2000).</i>	<i>185</i>
<i>Figure IV-6 : Évolution temporelle de la conductivité mesurée à chaque sonde et détermination du temps de mélange correspondant. Résultats tirés de la publication de Houcine et al. (2000).</i>	<i>185</i>
<i>Figure IV-7 : Illustration de la dispersion du nuage de Rhodamine 6G dans la direction axial et de sa rotation dans la direction transversale.....</i>	<i>188</i>
<i>Figure IV-8 : Positions relatives du plan du laser, des points d'injection et des contre-pales.</i>	<i>188</i>
<i>Figure IV-9 : Observations des images (en niveaux de gris) acquises dans le plan 1 lorsque 5 mL d'une solution $100 \mu\text{g L}^{-1}$ de rhodamine 6G sont injectés à la surface libre de l'eau à 3 cm ($T/10$) du bord de la cuve et lorsque le mobile TTP 125 tourne à la vitesse de rotation N_{js} (50 rpm).....</i>	<i>189</i>
<i>Figure IV-10 : Observations des images (en niveaux de gris) acquises dans le plan2 lorsque 5 mL d'une solution $400 \mu\text{g L}^{-1}$ de rhodamine 6G sont injectés à la surface libre de l'eau à 3 cm ($T/10$) du bord de la cuve et lorsque le mobile TTP 125 tourne à la vitesse de rotation N_{js} (50 rpm).....</i>	<i>190</i>
<i>Figure IV-11 : Observations des images (en niveaux de gris) acquises dans le plan 3 lorsque 5 mL d'une solution $800 \mu\text{g L}^{-1}$ de rhodamine 6G sont injectés à la surface libre de l'eau à 3 cm ($T/10$) du bord de la cuve et lorsque le mobile TTP 125 tourne à la vitesse de rotation N_{js} (50 rpm).....</i>	<i>190</i>

- Figure IV-12 : Distribution des concentrations observées en sept points différents dans 50 images correspondant à une concentration moyenne de $5 \mu\text{g L}^{-1}$ 193
- Figure IV-13 : Evolution du double de la valeur moyenne et de la valeur du percentile 99 de la distribution d'écart type observée dans le plan de mesure. 193
- Figure IV-14 : Mise en évidence de la variation de la répartition spatiale des niveaux de gris d'une image à l'autre. Les profils extraits correspondent aux niveaux de gris des pixels situés le long de la ligne jaune. 195
- Figure IV-15 : Evolution temporelle de la concentration maximale observée dans les 3 plans de mesure normée par la concentration de la solution injectée (plan 1 : ■■□, plan 2 : ▲▲△, plan 3 : ●●○). Les concentrations sont normées par la concentration de la solution injectée. Les résultats sont présentés pour les deux mobiles à des multiples de leur vitesse de rotation minimale de maintien des microporteurs en suspension complète. 198
- Figure IV-16 : Evolution temporelle de la fraction de surface du plan (%) caractérisée par une concentration supérieure à un seuil donné exprimé en % de la concentration de la solution injectée. Colonne de gauche : Mobile TTP 125 à N_{js} (50rpm), Colonne de droite : Mobile EE 150 à N_{js} (20 rpm). 200
- Figure IV-17 : Profils de pH mesurés dans la cuve de 1 L où sont réalisées les injections de soude (Osman et al, 2002)..... 203
- Figure IV-18 : Evolution de la $\sqrt{\text{variance}}/\text{moyenne}$ des niveaux de gris corrigés en fonction du numéro de l'image lorsque le mobile TTP 125 tourne à la vitesse de 60 rpm. La valeur inférieure à 0.05 est atteinte à l'image 104 qui correspond à un temps de 24.75 s..... 206
- Figure IV-19 : Evolution de la $\sqrt{\text{variance}}/\text{moyenne}$ des niveaux de gris corrigés en fonction du numéro de l'image lorsque le mobile TTP 125 tourne à la vitesse de 170 rpm. La valeur inférieure à 0.05 est atteinte à l'image 53 qui correspond à un temps de 10.25 s..... 206

Table des tableaux

Tableau IV-1 : Volume de NaCl injecté dans chaque cuve et temps d'injection correspondant.
..... 182

Tableau IV-2 : Vitesse de rotation du mobile utilisée pour déterminer les temps de mélange dans les différentes tailles de bioréacteur..... 183

Tableau IV-3 : Vitesses de rotation auxquelles ont été effectuées les mesures P.L.I.F..... 188

Bibliographie

Baldyga, J., Pohorecki, R., 1995. Turbulent micromixing in chemical reactors – A review. *Chemical Engineering Journal* 58, 183–195.

Chan, W.C.,W, Maxwell, D.G., Gao, X., Bailey, R.E., Han, M., Nie, S., 2002. Luminescent quantum dots for multiplexed biological detection and imaging. *Current Opinion in Biotechnology* 13, 40-46

Crimaldi, J.P., 1997. The effect of photobleaching and velocity fluctuations on single point LIF measurements. *Experiment in Fluids* 23, 325-330.

Greenville, R.K, Ruszkowski, S., Garret, E., 1995. Blending of miscible liquids in the turbulent and transional regimes. *Proceedings of the 15th NAMF mixing conference*, 18-23 june 1995, Banff, Canada.

Houcine, I., Plasari, E., David, R., 2000. Effects of the stirred tank's design on power consumption and mixing time in liquide phase. *Chemical Engineering Technology* 23, 605-613.

Langheinrich, C., Nienow, A.W., Eddleston, T., Stevenson, N.C., Emery, A.N., Clayton, T.M, Slater, N.K.H., 1998. Liquid homogenization studies in animal cell bioreactors of up to 8 m³ in volume. *Chemical Engineering Research and Design* 76, 107-116.

Nienow, A.W., Langheinrich, C., Stevenson, N.C., Emery, A.N, Clayton, T.M., Slater, N.K.H., 1996. Homogenisation and oxygen transfer rates in large agitated and sparged animal cell bioreactors: some implications for growth and production. *Cytotechnology* 22, 87-97.

Osman, J.J, Birch, J., Varley, J., 2001. The response of GS-NSO myeloma cells to pH shifts and pH perturbations. *Biotechnology and Bioengineering* 75, 63-73.

Osman, J.J., Birch, J., Varley, J., 2002. The response of GS-NSO myeloma cells to single and multiple pH perturbations. *Biotechnology and Bioengineering* 79, 398-407.

Pörtner, R., 2009. Chapitre II: Characteristics of mammalian cells and requirements for cultivation. *Cell and tissue reaction engineering: principles and practice*. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg.

Chapitre V :

Caractérisation lagrangienne de l'écoulement turbulent généré par les mobiles TTP 125 et EE 150 au sein du bioréacteur à cuve agitée utilisé en culture de cellules animales sur microporteurs

Résumé.....	214
1 Introduction.....	216
2 Conception du dispositif de trajectographie optique	216
2.1 Principe général de fonctionnement.....	216
2.2 Description du matériel.....	218
2.2.1 La particule	218
2.2.2 L'éclairage	223
2.2.3 Le dispositif d'enregistrement	223
2.3 Modélisation du dispositif.....	226
2.3.1 Définition du problème	226
2.3.2 Modélisation des caméras	228
2.3.3 Calculs des rayons réfractés.....	237
2.4 Algorithme de tri et de construction des trajectoires.....	241
3 Caractérisation des trajectoires obtenues	246
3.1 Structure des trajectoires.....	246
3.2 Isoprobabilité de présence et symétrie	249
3.3 Validation et convergence	253
4 Conclusion.....	261
Liste des symboles.....	262
Table des Figures	264
Table des Tableaux	268
Bibliographie	269

Résumé

Pour caractériser de manière lagrangienne l'écoulement au sein du bioréacteur, il faut disposer d'un dispositif expérimental qui permet de déterminer la trajectoire suivie par une particule au sein du bioréacteur durant une longue période. Ce type de dispositif n'existe pas « clé sur porte » et nous avons donc conçu et mis au point notre propre dispositif. Il s'agit d'un dispositif de trajectographie optique. Etant donné son caractère tout à fait original et unique, il semble important de consacrer un chapitre de cette thèse à décrire son principe, les développements qui ont été nécessaires à son fonctionnement et les caractéristiques intrinsèques des trajectoires qu'il permet de mesurer.

Le dispositif permet de déterminer la trajectoire suivie par une particule sphérique noire de $491\text{ }\mu\text{m}$ de diamètre au sein de la cuve étudiée dans cette thèse. Le processus de fabrication de la particule (micro-encapsulation d'huile de paraffine et de charbon actif dans un gel d'alginate de calcium) permet d'ajuster sa masse volumique (1028 kg m^{-3}) et sa couleur afin qu'elle puisse se comporter comme un élément de fluide tout en restant identifiable par rapport au reste de l'écoulement. Le dispositif se compose :

- De deux caméras (Falcon 4M60, Dalsa) synchronisées par un boîtier électronique extérieur et connectées *via* une carte d'acquisition à deux ordinateurs. Les axes optiques des deux caméras sont orthogonaux. Leur fréquence d'acquisition est égale à 60 Hz ;
- De deux panneaux backlights (Phlox) disposés sur les parois de la cuve diamétralement opposées aux caméras. Ils assurent un éclairage homogène et athermique de la cuve. Le fond blanc qu'ils produisent dans les images acquises par les caméras facilite l'identification de la particule noire.

Pour identifier la position 3D de la particule dans un référentiel spatial choisi *a priori*, une modélisation du dispositif est nécessaire. En effet, l'information acquise à chaque pas de temps par le dispositif correspond à deux couples de coordonnées de la particule dans les deux images. Ces coordonnées sont exprimées en pixels : $(x_{\text{pixels}}, y_{\text{pixels}})_{\text{caméra1}}$ et $(x_{\text{pixels}}, y_{\text{pixels}})_{\text{caméra2}}$. La coordonnée 3D (X, Y, Z) de la particule se calcule en déterminant l'intersection des deux faisceaux lumineux : le premier passe par le point focal de la caméra 1 et le pixel du capteur correspondant au couple $(x_{\text{pixels}}, y_{\text{pixels}})_{\text{caméra1}}$ et le second passe par le point focal de la caméra 2 et le pixel du capteur correspondant au couple $(x_{\text{pixels}}, y_{\text{pixels}})_{\text{caméra2}}$. L'orientation de ces deux faisceaux lumineux dans le référentiel spatial choisi est déterminée grâce à une calibration préalable des caméras. Lors de la calibration, la position des points focaux des caméras dans le référentiel spatial est calculée et les déformations introduites par leur optique (lentille Linos Inspecx.L 60 mm) sont évaluées. La déviation subie par les faisceaux lumineux suite à la réfraction intervenant aux interfaces entre les différents matériaux constituant la cuve et l'aquarium est prise en compte. Les lois de Snell-Descartes ont été appliquées en tenant compte de la nature des matériaux, de leur géométrie et de leur position dans le référentiel spatial choisi.

Afin de limiter la taille des fichiers de données enregistrés et d'accélérer leur traitement, les images mesurées par les caméras sont analysées en ligne lors de l'acquisition. Le logiciel spécifiquement développé permet de n'enregistrer que les données (position, taille, niveau de gris moyen, ...) relatives à un nombre limité d'objets détectés dans les images et susceptibles de correspondre à la particule suivie. À chaque pas de temps, la particule est ensuite identifiée parmi les candidats grâce à un algorithme de tri développé dans Matlab[®] qui se base principalement sur des considérations physiques et cinématiques. La trajectoire de la particule est ainsi construite point par point à partir de ses positions successives identifiées à chaque pas de temps.

Des trajectoires ont été mesurées dans trois conditions différentes : à deux vitesses de rotation, égales à N_{js} (50 rpm) et $2 N_{js}$, pour le mobile TTP 125 et à une vitesse de rotation N_{js} (20 rpm) pour le mobile EE 150. Les durées totales d'acquisition sont respectivement égales à 42 h, 20 h et 12 h.

L'observation des trajectoires obtenues montre que la structure de l'écoulement moyen mesurée par P.I.V. (Chapitre III) est globalement retrouvée. Les trajectoires forment des boucles axiales autour du mobile dans les plans xy et zy et forment des structures qui tournent autour de l'axe de rotation du mobile dans le même sens que ce dernier dans le plan xz . La nature « aléatoire » de l'écoulement turbulent est également observée car aucun fragment de trajectoire n'est identique au précédent; ils ont tous des formes différentes.

Le dispositif utilisé n'a pas permis d'obtenir une trajectoire parfaitement continue sur toute la durée de l'acquisition, car, à certains pas de temps, la particule n'est pas identifiée. Ce caractère discontinu des trajectoires est potentiellement problématique car il correspond à une perte d'une partie de l'information. A condition d'en tenir compte, il n'empêche toutefois pas une analyse quantitative des trajectoires mesurées. En effet, les mesures ont permis de confirmer la propriété d'isoprobabilité de présence de la particule dans tout volume élémentaire de la cuve agitée. L'information mesurée par trajectographie dans une moitié de cuve est donc représentative de l'ensemble de la cuve. Les grandeurs issues de l'analyse quantitative des trajectoires sont donc calculées sur base des mesures réalisées dans la moitié de la cuve où la particule est le mieux suivie.

Enfin, la validité et la convergence des résultats obtenus par trajectographie ont pu être vérifiées car les champs de vitesse calculés à partir des trajectoires sont en très bon accord avec ceux mesurés par 3D P.I.V..

1 Introduction

Dans ce chapitre, nous abordons la caractérisation lagrangienne de l'écoulement qui est la deuxième partie de la méthodologie développée dans cette thèse. Cette étape est nécessaire pour répondre à la question posée dans cette thèse qui est la caractérisation du lien existant entre les conditions d'agitation du bioréacteur d'une part et l'environnement physico-chimique perçu par les cellules animales fixées sur les microporteurs d'autre part. En effet, comme mentionné dans les Chapitres I et III, une caractérisation purement eulérienne de l'écoulement ne suffit pas, car les propriétés hydrodynamiques de l'écoulement turbulent ne sont pas réparties de manière homogène dans la cuve. Ainsi, la succession de conditions hydrodynamiques rencontrées par un microporteur au cours du temps ne peut être déterminée que si l'on connaît la répartition spatiale des grandeurs (approche eulérienne) et le chemin suivi par le microporteur au cours du temps (approche lagrangienne). Il faut donc posséder un dispositif expérimental qui permet de déterminer la trajectoire suivie par une particule au sein du bioréacteur durant une longue période. Ce type de dispositif est très rare et n'existe pas clé sur porte. Nous avons donc dû concevoir et mettre au point notre propre dispositif. Parmi les différentes techniques de trajectographie mentionnées dans la littérature, nous avons choisi de construire un dispositif de trajectographie optique. Les raisons de ce choix sont multiples : le prix d'achat des appareils qui constituent le dispositif reste abordable. Ce type de dispositif n'est pas soumis à une législation lourde contrairement aux techniques P.E.P.T. et C.A.R.P.T. qui utilisent une particule de traceur radioactive. Enfin, la limitation d'être dans un milieu optiquement transparent a déjà été imposée par les précédentes techniques expérimentales utilisées dans cette thèse. Vu le caractère tout à fait original et unique de notre appareil, il semble important de décrire son principe et les développements qui ont été nécessaires à son fonctionnement. C'est à quoi est consacré ce chapitre. Les caractéristiques propres des trajectoires obtenues seront également discutées. Entre autre, la convergence des résultats sera démontrée ainsi que leur validité grâce à la comparaison des champs de vitesse obtenues par trajectographie avec ceux mesurés par 3D P.I.V..

2 Conception du dispositif de trajectographie optique

2.1 Principe général de fonctionnement

Un dispositif de trajectographie mesure la position d'une particule de traceur à différents instants. Le résultat obtenu est donc un tableau où chaque ligne contient un temps t et les trois coordonnées spatiales (X,Y,Z) de la particule à ce temps dans le référentiel spatial choisi.

Pour obtenir ce résultat, les différents éléments illustrés à la Figure V-1 sont nécessaires. Tout d'abord, il faut une particule qui soit un traceur idéal. Il faut qu'elle se comporte comme un élément de fluide ce qui implique qu'elle soit capable de suivre toutes les structures de l'écoulement quelle que soit leur taille. Elle doit cependant se distinguer du fluide par une de ses propriétés (couleur, par exemple) afin d'être identifiable par rapport au reste de l'écoulement. Dans le cas présent, la particule utilisée est sphérique, a une densité très proche

du milieu de culture et est noire. Afin de mettre en évidence la particule dans la cuve, deux panneaux lumineux de type backlight sont placés sur deux faces de l'aquarium. La particule noire ressort ainsi clairement du fond blanc produit par les panneaux. L'enregistrement des trois coordonnées spatiales de la particule à différents instants est réalisé grâce à un dispositif se composant de deux caméras placées vis-à-vis de la cuve du côté opposé à celui des panneaux backlights. Les signaux enregistrés par les caméras sont synchronisés par un boîtier électronique extérieur et les images acquises par chaque caméra sont transmises *via* une carte d'acquisition à un ordinateur qui les traite pour identifier la position de la particule dans l'image. Ce dispositif permet de mesurer les deux doublets de coordonnées de la particule dans les deux images exprimés en pixels : $(x_{pixels}, y_{pixels})_{caméra1}$ et $(x_{pixels}, y_{pixels})_{caméra2}$. Il ne donne donc pas directement les trois coordonnées spatiales de la particule aux différents instants. La coordonnée 3D (X,Y,Z) de la particule dans un référentiel choisi *a priori* doit être calculée en déterminant l'intersection des deux faisceaux lumineux qui passent respectivement par le point focal de la caméra 1 et le pixel du capteur correspondant au couple $(x_{pixels}, y_{pixels})_{caméra1}$ et le point focal de la caméra 2 et le pixel du capteur correspondant au couple $(x_{pixels}, y_{pixels})_{caméra2}$. L'orientation de ces deux faisceaux lumineux dans le référentiel spatial choisi doit donc être déterminée, ce qui implique une « modélisation » des caméras. Cette modélisation permettra non seulement de déterminer la position de leur point focal dans le référentiel spatial choisi, mais également de tenir compte des déformations introduites par l'optique de chaque caméra. Avant leur intersection, les faisceaux lumineux subissent un certain nombre de déviations puisqu'ils traversent les différents matériaux constituant la cuve et l'aquarium. Leur orientation doit donc être corrigée en appliquant les lois de Snell-Descartes et en tenant compte de la nature des matériaux, de leur géométrie et de leur position dans le référentiel spatial choisi.

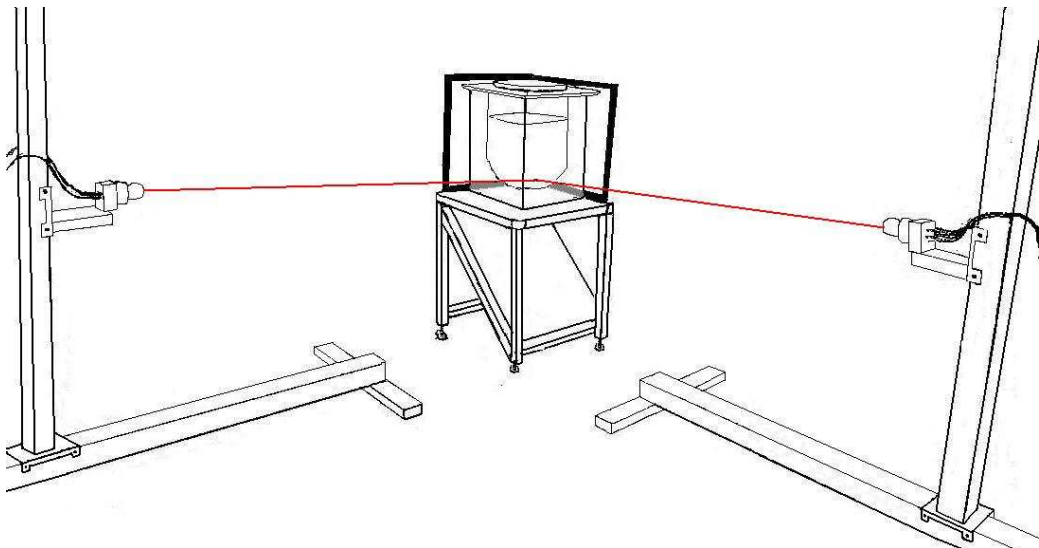


Figure V-1 : Schéma de principe du dispositif de trajectographie optique.

Dans les sections suivantes, le matériel qui compose le dispositif, les modèles élaborés pour calculer la position 3D de la particule et la démarche développée pour en extraire la trajectoire seront présentés en détails.

2.2 Description du matériel

2.2.1 La particule

a) Caractéristiques d'un traceur idéal

La particule de traceur est un des éléments clés du dispositif. Ses caractéristiques influencent grandement la qualité des mesures. Elle doit se comporter comme un traceur idéal c'est-à-dire qu'elle doit être capable de suivre toutes les structures locales de l'écoulement turbulent quelle que soit leur taille. Un moyen d'évaluer cette capacité est de déterminer un nombre de Stokes St qui compare le temps de réponse τ_p nécessaire à la particule pour s'ajuster à un changement de vitesse et de direction du fluide, au temps caractéristique τ_f des structures locales de l'écoulement. La particule suit parfaitement l'écoulement local lorsque St est largement inférieur 1.

Pour vérifier cette condition, il faut quantifier le temps de réponse de la particule τ_p et les temps caractéristiques des structures locales τ_f .

Le temps caractéristique des différents tourbillons présents au sein de l'écoulement peut s'estimer par le *ratio* de leur taille l par leur vitesse v . Ces deux grandeurs peuvent se calculer à partir de grandeurs caractéristiques de l'écoulement turbulent pour les tourbillons qui correspondent à des échelles caractéristiques. Ainsi les tourbillons contenant toute l'énergie cinétique turbulente k et correspondant à l'échelle de Taylor λ_{Taylor} ont un temps caractéristique qui s'exprime par :

$$\tau_{f, \text{échelle}_Taylor} = \frac{\lambda_{Taylor}}{\sqrt{k}} \quad (V-1)$$

De même les tourbillons correspondant à l'échelle de Kolmogorov λ_K ont un temps caractéristique égal à :

$$\tau_{f, \text{échelle}_Kolmogorov} = \frac{\lambda_K}{v} = \frac{(v^3 / \varepsilon)^{1/4}}{(v\varepsilon)^{1/4}} = \left(\frac{v}{\varepsilon} \right)^{1/2} \quad (V-2)$$

Grâce à l'étude eulérienne présentée au Chapitre III, les répartitions spatiales de k , λ_{Taylor} et ε sont connues en fonction des conditions d'agitation (type de mobile, N). Il est donc possible de déterminer les valeurs minimales des temps caractéristiques $\tau_{f, \text{échelle}_Taylor}$ et $\tau_{f, \text{échelle}_Kolmogorov}$. Les valeurs minimales de $\tau_{f, \text{échelle}_Taylor}$ sont respectivement de l'ordre de 2×10^{-2} s et 1×10^{-2} s pour des vitesses de rotation égales à N_{js} et $2 N_{js}$. Celles de $\tau_{f, \text{échelle}_Kolmogorov}$ sont respectivement de l'ordre de 1.5×10^{-2} s et 5×10^{-3} s dans ces mêmes conditions.

Pour obtenir $St \ll 1$, le temps de réponse de la particule doit être largement inférieur à ces valeurs. Il peut s'estimer par le *ratio* entre sa vitesse limite de chute dans un fluide stagnant v_{lim} et l'accélération de la pesanteur g :

$$\tau_p(s) = \frac{v_{lim}(ms^{-1})}{g(ms^{-2})} \quad (V-3)$$

La vitesse limite de chute dépend de la différence de densité entre la particule et le fluide, de la forme de la particule et de son diamètre. Le temps de réponse τ_p sera d'autant plus court que la différence de densité entre la particule et le fluide sera faible et que la particule sera petite. La particule ne sera capable de suivre les plus petites structures d'écoulement que si sa taille est inférieure à la valeur minimale de l'échelle de Kolmogorov. Il faut cependant trouver un compromis car il faut que la particule soit suffisamment grosse afin d'être détectable par le dispositif de mesure.

b) Fabrication du traceur

La particule de traceur est une bille sphérique composée d'un gel d'alginate de calcium dans lequel sont encapsulés une poudre de charbon actif afin de lui donner une coloration noire et de l'huile de paraffine afin d'ajuster sa densité à une valeur proche de celle du fluide.



Figure V-2 : Bille d'alginate.

Pour fabriquer des billes d'alginate de calcium, il suffit de laisser tomber des gouttes d'une solution d'alginate de sodium dans une solution de chlorure de calcium. La fabrication de billes dont le diamètre est inférieur à 1 mm, implique l'utilisation d'un dispositif plus élaboré qu'une simple seringue, comme, par exemple, un générateur de gouttes à courant d'air coaxial. Comme le montre le schéma de la Figure V-3, l'aiguille de la seringue est placée au centre d'un tube creux dans lequel de l'air comprimé est injecté. Ce flux d'air favorise le détachement de la goutte d'alginate de sodium à une taille inférieure à celle qui serait obtenue en l'absence du flux d'air. Ce dispositif expérimental a été mis à notre disposition par le Centre Interfacultaire des Biomatériaux (Pr. Grandfils).

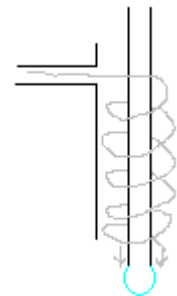


Figure V-3 : Générateur de gouttes à courant d'air coaxial mis à disposition par le Centre Interfacultaire des Biomatériaux (gauche) : photo montrant la solution de CaCl_2 et le générateur au centre duquel se trouve l'aiguille de la seringue contenant la solution de Na-Alginate (droite) : schéma de principe du générateur montrant comment l'air est injecté dans le cylindre creux et favorise le détachement des gouttes.

Pour fabriquer une bille aux caractéristiques définies, de nombreuses variables opératoires doivent être optimisées :

- Les pourcentages en masse de l'alginate de sodium et du chlorure de calcium dans les solutions aqueuses respectives influencent la résistance mécanique du gel formé. Des essais ont été réalisés avec des solutions contenant entre 1 % et 2 % en masse d'alginate de sodium et entre 2 et 4 % en masse de chlorure de calcium. Une bonne résistance mécanique est observée pour toutes ces conditions pour autant que les billes soient

conservées dans la solution de chlorure de calcium. En effet, lorsque les billes sont lavées et placées dans de l'eau désionisée, un gonflement par effet osmose est observé. Ce gonflement peut même entraîner la dissolution du gel. Dès lors, pour éviter toute évolution des propriétés de la bille lors des mesures de trajectographie, la cuve en verre de 20 L sera remplie avec une solution de chlorure de calcium.

- La quantité de charbon actif encapsulé dans la bille détermine sa couleur. Des billes avec une coloration noire homogène sont obtenues à partir d'un pourcentage en masse de charbon actif encapsulé égal à 2 %.
- La distance entre la pointe de l'aiguille où se forme la goutte d'alginate de sodium et la surface de la solution de chlorure de calcium influence la forme de la bille. Divers essais ont montré qu'il faut une distance d'au moins 100 mm pour que la goutte qui se décroche puisse prendre une forme sphérique pendant sa chute. Elle conserve cette forme lorsqu'elle entre en contact avec la solution de chlorure de calcium et que le gel d'alginate de calcium se forme.
- Le débit du gaz injecté dans le cylindre creux influence directement la taille des billes formées. Ainsi un débit de $0.6 \text{ m}^3 \text{ h}^{-1}$ génère des billes avec un diamètre moyen d'environ $500 \text{ }\mu\text{m}$ tandis qu'un débit de $0.4 \text{ m}^3 \text{ h}^{-1}$ produit des billes avec un diamètre moyen d'environ $700 \text{ }\mu\text{m}$.
- Le pourcentage en masse d'huile de paraffine encapsulée dans la bille influence sa densité. La quantité nécessaire pour obtenir des billes qui semblent rester « entre deux eaux » lorsqu'elles sont dans la solution aqueuses de chlorure de calcium dépend de la densité de la solution de chlorure de calcium et donc de son pourcentage en masse mais également des pourcentages en masse des autres constituants présents dans la bille. Des billes contenant 1 %, 2 % et 5 % en masse respectivement d'alginate de sodium, de charbon actif et d'huile de paraffine semblent rester « entre deux eaux » lorsqu'elles sont placées dans une solution aqueuse contenant 4 % en masse de chlorure de calcium.

c) Caractérisation des billes fabriquées

Parmi les billes fabriquées, celles qui semblent rester « entre deux eaux » lorsqu'elles sont placées dans la solution de chlorure de calcium sont séparées les unes des autres et identifiées. Chaque bille ainsi sélectionnée est ensuite étudiée pour déterminer ses deux caractéristiques essentielles en tant que traceur potentiel: sa taille et son temps caractéristique.

La caractérisation de la taille et de la forme des particules est réalisée sur base de photographies obtenues avec un microscope optique (Olympus Provis Modèle AX 70 TRF, grossissement X10) et analysées avec le logiciel Lucia (v 4.80, Cz).

La détermination du temps caractéristique des particules implique la mesure de leur vitesse limite de chute dans la solution de chlorure de calcium (4 % en masse). Une colonne en plexiglas de 1.50 m de haut et 100 mm de diamètre a été construite dans ce but (Figure V-4). Cette colonne est remplie avec la solution de chlorure de calcium. Après vérification du caractère stagnant du liquide, la particule est lâchée au sommet de la colonne. Durant les premiers centimètres, elle accélère avant d'atteindre sa vitesse limite de chute. Cette vitesse

limite est mesurée en chronométrant le temps que met la particule pour parcourir une distance donnée, égale à 249 mm et matérialisée par deux traits horizontaux sur la paroi de la colonne. Ces deux marques sont situées dans les 2/3 inférieurs de la colonne, afin d'être certain que la particule a effectivement atteint sa vitesse limite de chute. La particule est récupérée après les mesures grâce à un robinet situé en pied de colonne. Ce protocole expérimental fonctionne assez bien lorsque la particule est plus dense que la solution de chlorure de calcium. Dans le cas où les deux densités sont très proches, de nombreux phénomènes viennent perturber la mesure, la rendant quasi impossible. Pour ces particules, une autre approche doit être adoptée pour déterminer leur vitesse limite de chute dans la solution de chlorure de calcium. Elle consiste à déterminer la densité de la particule par la mesure de sa vitesse limite de chute dans un fluide moins dense qui est de l'huile de paraffine ($\rho_{\text{huile}} = 856 \text{ kg m}^{-3}$). Connaissant le diamètre de la particule et sa densité, il sera possible d'estimer numériquement sa vitesse limite de chute dans la solution de chlorure de calcium. Pour estimer la densité de la particule, la colonne est remplie avec l'huile de paraffine et le protocole ci-dessus est appliqué. La particule a bien entendu préalablement été rincée dans différentes solutions d'huile de paraffine pour éliminer toute trace de la solution de chlorure de calcium à sa surface.

La masse volumique de la particule peut être obtenue à partir de la mesure de la vitesse limite de chute de la particule dans l'huile de paraffine *via* la relation :

$$v_{\text{lim}} = \sqrt{\frac{4g d_p (\rho_p - \rho_l)}{3\rho_l C_x}} \quad (\text{V-4})$$

où d_p est le diamètre de la particule, ρ_p et ρ_l sont les masses volumiques de la particule et de l'huile de paraffine et C_x est le coefficient de trainée de la particule. Ce dernier dépend du nombre de Reynolds de la particule Re_p . Pour une particule sphérique, il vaut :

$$C_x = \frac{24}{Re_p} \text{ si } Re_p < 1 \text{ (régime de Stokes)} \quad (\text{V-5})$$

$$C_x = \frac{26}{Re_p^{0.77}} \text{ si } 1 < Re_p < 10 \text{ (régime transitoire)} \quad (\text{V-6})$$

$$\text{Avec } Re_p = \frac{v_{\text{lim}} d_p}{\nu_l} \quad (\text{V-7})$$

où ν_l est la viscosité cinématique de l'huile de paraffine.

La vitesse limite de chute de la particule dans la solution de chlorure de calcium se calcule avec les mêmes relations, en remplaçant les propriétés de l'huile de paraffine (ρ_l , ν_l) par celles de la solution de chlorure de calcium.

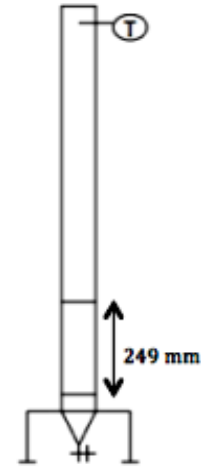


Figure V-4 :
Colonne en plexiglas
($H=1.5 \text{ m}$, $\varnothing=100 \text{ mm}$)
servant à la mesure de la
vitesse de chute de la
particule.

Le Tableau V-1 présente les résultats obtenus pour la particule utilisée comme traceur dans ce travail. Les valeurs de la densité et de la viscosité de l'huile de paraffine et de la solution aqueuse de chlorure de calcium ont été déterminées expérimentalement à l'aide d'un viscosimètre (Brookfield, modèle LVDV-E) et par la mesure de la masse du contenu d'un jaugé de 100 mL thermostatisé à 20°C.

Tableau V-1 : Présentation des caractéristiques de la particule utilisée comme traceur dans ce travail.

Données	ρ_{huile} kg m ⁻³	856	V_{huile} m ² s ⁻¹	34×10 ⁻⁶	ρ_{CaCl2} kg m ⁻³	1021	V_{CaCl2} m ² s ⁻¹	1×10 ⁻⁶	
Particule					d_p μm	Coeff. Forme -	V_{lim} Huile m s ⁻¹	Re_p Huile -	ρ_p kg m ⁻³
Composition			N° Ech	Q_g m ³ h ⁻¹					
wt % NaAg	wt % Ch.act	wt % huile							
1	2	5	10_4	0.6	491	0.96	7.9×10 ⁻⁴	0.011	1028

Si $Re_{p,CaCl2}<1$			Si $1<Re_{p,CaCl2}<10$			$St_{échelle_Taylor}$		$St_{échelle_Kolmogorov}$	
V_{lim} CaCl ₂ m s ⁻¹	Re_p CaCl ₂ (-)	τ_p s	V_{lim} CaCl ₂ m s ⁻¹	Re_p CaCl ₂ (-)	τ_p (-)	N_{js} $\tau_{f\equiv}$ 0.01 s	2 N_{js} $\tau_{f\equiv}$ 0.02 s	N_{js} $\tau_{f\equiv}$ 0.015 s	2 N_{js} $\tau_{f\equiv}$ 0.005 s
0.9×10 ⁻³	0.44	0.91×10 ⁻⁴	3.7×10 ⁻³	1.67	3.7×10 ⁻⁴	0.037	0.019	0.025	0.074

L'analyse de l'image acquise au microscope montre que la bille est sphérique car son coefficient de forme, qui vaut 0.96, est très proche de 1. Son diamètre vaut 491 μm . Sa masse volumique, calculée à partir de la mesure de sa vitesse de chute dans l'huile de paraffine, est égale à 1028 kg m⁻³. La différence de masse volumique entre la bille et la solution de chlorure de calcium est ainsi très faible car cette différence vaut seulement 7 kg m⁻³ en valeur absolue, ce qui correspond à une différence de 0.7 % en valeur relative.

Le calcul de la vitesse de chute de la particule dans la solution de chlorure de calcium (Equation V.4) fait intervenir son coefficient de trainée C_x , dont la valeur dépend de son nombre de Reynolds Re_p . Or, ce nombre de Reynolds ne peut être calculé que lorsque l'on connaît la vitesse de chute de la particule dans la solution de chlorure de calcium. Il va donc falloir faire une hypothèse sur la valeur du nombre de Reynolds de la particule, calculer la vitesse limite de la particule à l'aide de la Formule V-5 et puis vérifier la validité de l'hypothèse. Le calcul est réalisé pour les deux hypothèses : $Re_p < 1$ et $1 < Re_p < 10$. Dans les deux cas, les vitesses limites de chute calculées vérifient l'hypothèse sur le nombre de Reynolds, mais elles diffèrent d'un facteur 4. Déterminer laquelle des deux valeurs est la bonne est difficile. En effet, pour une différence de densité aussi faible entre la particule et la solution de chlorure de calcium, la mesure expérimentale de la vitesse limite de chute est trop perturbée par des phénomènes parasites que pour être très précise. Par sécurité, le nombre de Stokes de la particule sera évalué dans le cas le plus défavorable c'est-à-dire pour la vitesse limite de chute égale à 3.7×10^{-3} m s⁻¹ et donc pour le temps caractéristique égal à 3.7×10^{-4} s. Le Tableau V-1 montre que pour les deux vitesses de rotation et les deux échelles caractéristiques des tourbillons (l'échelle de Taylor et l'échelle de Kolmogorov), la particule se comporte comme un traceur idéal car la valeur de son nombre de Stokes est largement

inférieur à 1. Il est de l'ordre de 10^{-2} , ce qui semble montrer que la particule peut suivre toutes les structures locales de l'écoulement. Ce n'est pas tout à fait vrai car la particule sera insensible aux tourbillons locaux dont la taille est inférieure à son diamètre. Dès lors, la particule utilisée dans ce travail est un traceur idéal pour suivre les structures locales dont la taille caractéristique est supérieure ou égale à $491\ \mu\text{m}$.

2.2.2 L'éclairage

Le but de l'éclairage est d'améliorer le contraste entre la particule et le reste de la cuve. Un bon dispositif doit avoir les deux caractéristiques suivantes :

- Il doit éclairer de manière homogène afin de faciliter l'identification de la particule quelle que soit sa position ;
- Il doit éclairer de manière athermique afin d'éviter tout échauffement de la cuve, qui induirait une modification de la densité du liquide et/ou de la particule.

Les panneaux backlights commercialisés par la société Phlox (Figure V-5) remplissent ces deux critères. Il s'agit de panneaux carrés de 540 mm de côté et de 8 mm d'épaisseur composés de leds blanches. Ils produisent un éclairage blanc homogène avec une luminance de $70\,000\ \text{cd m}^{-2}$. Ces panneaux, placés du côté opposé de la cuve par rapport aux caméras éclairent la cuve par rétro-éclairage. La particule, noire, est ainsi mise en évidence sur le fond blanc produit par les panneaux.



Figure V-5 : Panneau backlight (Phlox S.A.).

2.2.3 Le dispositif d'enregistrement

Le dispositif d'enregistrement se compose de deux caméras dont les signaux sont synchronisés par un boîtier électronique extérieur. Les images acquises par chaque caméra sont transmises *via* une carte d'acquisition à un ordinateur qui les traite pour identifier la position de la particule dans l'image.

a) Les caméras

L'utilisation de seulement deux caméras est suffisante pour déterminer la position dans l'espace d'un objet. Il suffit pour cela, que les caméras enregistrent de manière synchronisée la même scène mais qu'elles l'observent selon des angles de vues différentes. La relation mathématique qui relie la position de l'objet dans l'image acquise par chaque caméra $(x_{\text{pixels}}, y_{\text{pixels}})_{\text{cam1}}$ et $(x_{\text{pixels}}, y_{\text{pixels}})_{\text{cam2}}$ à sa position dans l'espace (X, Y, Z) requiert une calibration qui sera présentée dans la Section 2.3 ci-après. Notons qu'initialement le dispositif de trajectographie avait été prévu avec trois caméras; la troisième caméra observant l'aquarium et la cuve à travers leur face inférieure. L'intérêt de ce type de configuration est que l'on minimise la taille des zones de la cuve où il est impossible de déterminer la position de la particule car elle ne peut être observée que par une seule caméra, étant située derrière le mobile ou son axe de rotation, donc invisible pour les deux autres caméras. Au départ, tous les développements ont été réalisés pour cette configuration à trois caméras. Il n'a cependant pas été possible d'exploiter les mesures réalisées avec la troisième caméra car la partie

inférieure du fond hémisphérique de la cuve en verre comporte des défauts qui introduisent des déformations dans les images acquises qui ne peuvent pas être corrigés numériquement. Le choix du modèle de caméra n'est pas anodin. Il aura un impact direct sur les caractéristiques des trajectoires mesurées. En effet, sa fréquence d'acquisition fixe à quelle fréquence la trajectoire est échantillonnée et sa résolution spatiale fixe la taille minimale des particules détectables. Deux caméras Falcon 4M60 (Teledyne Dalsa) ont été choisies. Elles sont équipées d'une optique Linos Inspecx.L 60 mm montée sur une bague de mise au point Modular Focus 0 à +25 mm. Leur fréquence d'acquisition est de 60 Hz, ce qui semble être un bon compromis entre l'obtention d'une information suffisante pour une analyse quantitative de la trajectoire et la complexité des traitements liés à la manipulation de très grandes quantités de données. Les caméras sont équipées de capteurs CMOS contenant 2352 pixels en largeur et 1728 pixels en hauteur. Sur les images, la particule apparaît comme une tache plus sombre. Pour déterminer précisément (à moins d'un pixel près), la position du centre de la particule, il faut ajuster une surface de Gauss sur cette tache. Cet ajustement ne peut être réalisé que si la tache a une largeur et une hauteur supérieures ou égales à 3 pixels. Si on tient compte de la taille de la zone à observer, correspondant à un carré de 300 mm de côté, et de la résolution du capteur, on obtient une résolution spatiale de $0.17 \text{ mm pixel}^{-1}$ ($= 300/1728$) dans la direction verticale et de $0.13 \text{ mm pixel}^{-1}$ ($= 300/2352$) dans la direction horizontale. La taille minimale de la particule dans la présente configuration est donc de l'ordre de $500 \mu\text{m}$.

Comme le montre la Figure V-6, chaque caméra est fixée sur un dispositif linéaire composé de deux rails en aluminium. Ce dispositif permet de régler l'éloignement et la hauteur de la caméra. Après serrage des vis de calage, il assure également que les caméras ne bougent plus. Les deux rails horizontaux sont fixés dans le sol et orientés de telle manière que l'angle formé entre les axes optiques des deux caméras soit le plus proche possible de 90° .

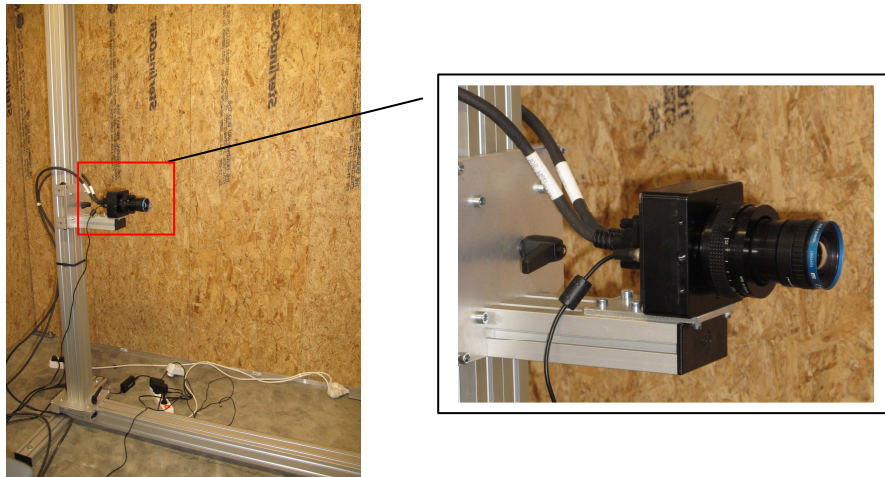


Figure V-6 : Caméra Falcon 4M60 avec son optique Linos Inspecx.L et son dispositif linéaire.

b) Chaîne d'acquisition

Les caméras sont contrôlées par un synchroniseur externe (Timing Controller CC320, Gardasoft) afin d'assurer l'enregistrement simultané des images par les deux caméras. Le synchroniseur envoie à la carte d'acquisition (framegrabber X64 Xcelera, Teledyne Dalsa) de chaque caméra des pulses électriques à une fréquence de 60 Hz. Les cartes d'acquisition des

deux caméras sont installées dans deux ordinateurs séparés. Les images acquises par chaque caméra sont transmises *via* des câbles de type « cameralink » et *via* la carte d'acquisition à l'ordinateur qui lui est dédié. Les deux ordinateurs sont chacun équipés d'un processeur Pentium 4 core 3Ghz (modèle E8400) couplé à une mémoire vive de 2Gb.

c) Traitement en ligne des images

Afin de réduire la taille des fichiers de données enregistrés et le temps nécessaire à leur traitement, chaque image transmise à l'ordinateur est traitée immédiatement afin d'enregistrer uniquement l'information utile. La nécessité de ce traitement « en ligne » se comprend aisément si on fait le petit calcul suivant : l'enregistrement pendant une heure (3600 s) à une fréquence de 60 Hz d'images correspondant à un volume de 2.6 Mo chacune requiert un espace de 548 Gb sur le disque dur. Or la mesure d'une trajectoire implique des mesures pendant plusieurs heures consécutives.

Le traitement en ligne des images est réalisé grâce un logiciel spécifique élaboré en partenariat avec Yves Daoust de la société Vision for Vision sprl. Ce logiciel réalise les opérations suivantes lorsqu'il reçoit une image :

1. Seuillage et binarisation des images ;
2. Identification des groupes de pixels noirs ;
3. Sélection des objets identifiés dont les dimensions (largeur, hauteur et surface) exprimées en pixels sont comprises dans une gamme compatible avec les dimensions de la particule de traceur ;
4. Calcul des coordonnées du centre de l'objet dont la forme est approximée par une courbe de Gauss ;
5. Enregistrement des données dans un fichier texte (.txt). Chaque ligne du fichier txt correspond à un objet sélectionné pour une image donnée, cet objet pouvant être la particule ou un faux candidat. Chaque ligne contient le temps (en μ s) auquel l'image donnée a été acquise, la position de l'objet dans l'image exprimée par le couple (x_{pixels} , y_{pixels}), son niveau de gris et les dimensions de l'objet (largeur, hauteur) exprimées en pixel.

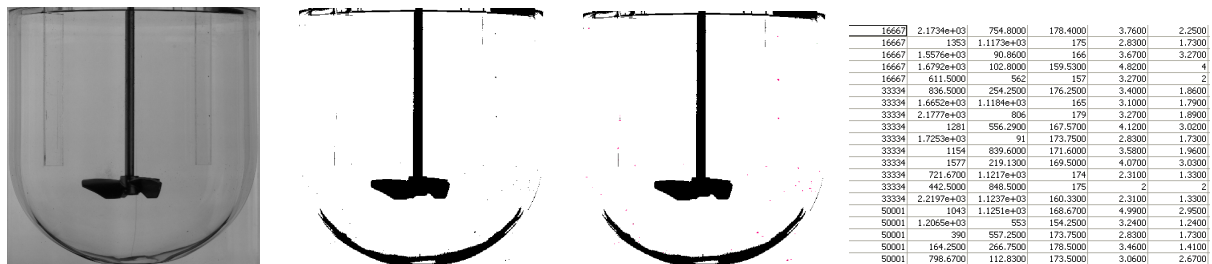


Figure V-7 : Illustration des traitements réalisés à l'aide du logiciel pour identifier la position dans l'image de candidats pouvant être potentiellement la particule.

En cours de fonctionnement, le logiciel affiche deux éléments : l'image en cours de traitement et un tableau de contrôle (Figure V-8). Ce dernier permet de fixer les valeurs des différents critères de sélection (niveau du seuil, dimensions des objets sélectionnés) en fonction des conditions d'expérience. L'effet de ces critères est directement observable sur l'image grâce

à un code couleur (vert pour les objets sélectionnés, rouge pour les groupes de pixels identifiés mais non sélectionnés). Une option du logiciel permet également de définir les dimensions caractéristiques de la particule sur base de quelques images dans lesquelles la particule a été identifiée manuellement.

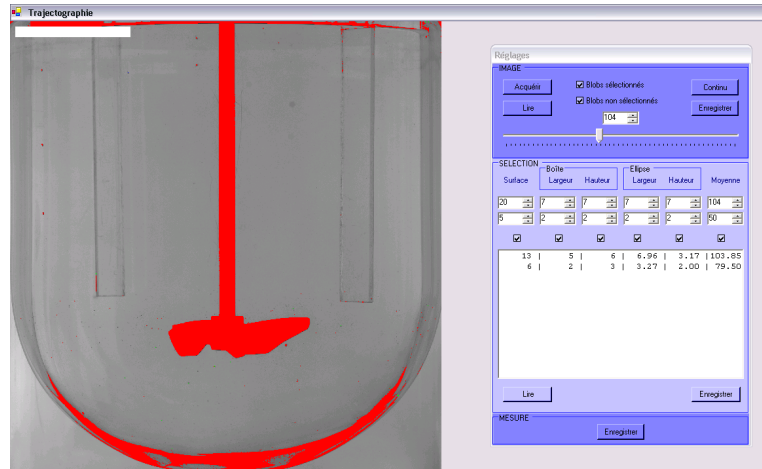


Figure V-8 : Tableau de contrôle du logiciel développé en partenariat avec Y. Daoust.

Ce logiciel permet donc de stocker l'information enregistrée pour chaque caméra dans un fichier txt contenant, pour chaque image, les données correspondant aux candidats susceptibles d'être la particule. Pour une acquisition d'une heure, la taille des fichiers est en moyenne de 1.5 Gb et contient environ 2×10^7 lignes.

Pour chaque expérience, les deux fichiers txt générés devront ensuite être traités pour identifier, à chaque pas de temps, le candidat qui correspond à la particule. Cet algorithme de tri est réalisé dans l'environnement Matlab® (v.R2010.a) et est présenté dans la Section 2.4. Cet algorithme a besoin cependant de la relation mathématique qui relie la position de l'objet dans l'image acquise par chaque caméra $(x_{pixels}, y_{pixels})_{cam1}$ et $(x_{pixels}, y_{pixels})_{cam2}$ à sa position dans l'espace (X, Y, Z) . Cela requiert une modélisation du dispositif qui est présentée dans la Section 2.3 ci-après.

2.3 Modélisation du dispositif

2.3.1 Définition du problème

L'information fournie par les caméras est la position, exprimée en pixels, d'un objet dans les images acquises par les caméras. A chaque instant, il s'agit donc de deux couples de coordonnées : $(x_{pixels}, y_{pixels})_{cam1}$ et $(x_{pixels}, y_{pixels})_{cam2}$ pour lesquels l'origine du repère est situé dans le coin supérieur gauche de chacune des images (Figure V-9). La position de l'objet dans un repère spatial tridimensionnel fixé *a priori* doit être déduite de ces deux couples de coordonnées. Ce repère spatial, appelé dans la suite du document « repère commun », est positionné comme indiqué dans la Figure V-10. Les axes \vec{x} et \vec{y} sont situés dans le plan d'une face de l'aquarium et l'axe \vec{z} est normal à ce plan. L'origine du repère est située à l'intersection entre l'arête de l'aquarium avec le plan de la face inférieure de la plaque en plexiglas reposant sur la table en aluminium.

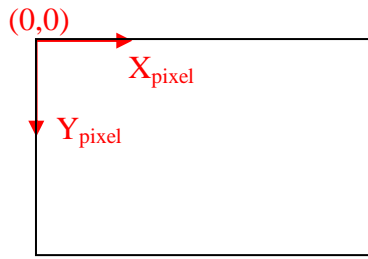


Figure V-9 : Position du repère dans l'image.

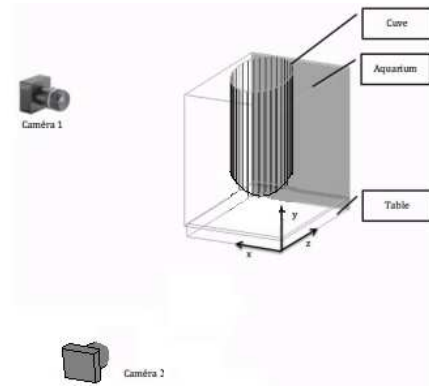


Figure V-10 : Position du repère spatial commun.

Pour résoudre le problème posé, nous nous baserons sur le postulat suivant, illustré à la Figure V-11, qui est à la base de la modélisation mathématique des caméras par un type de modèle appelé « pinhole » : « Dans l'espace tridimensionnel, les trois points correspondant respectivement à l'objet, à son image sur le capteur de la caméra et le point focal de la caméra sont alignés selon une droite ». La position de l'objet pourra donc être obtenue en calculant l'intersection des deux droites passant par le point focal de chaque caméra et la projection de l'objet sur son capteur. Il faut donc déterminer la position du point focal de chaque caméra (F_1, F_2), ainsi que l'orientation des deux droites (\vec{v}_1, \vec{v}_2) , dans le référentiel spatial choisi.

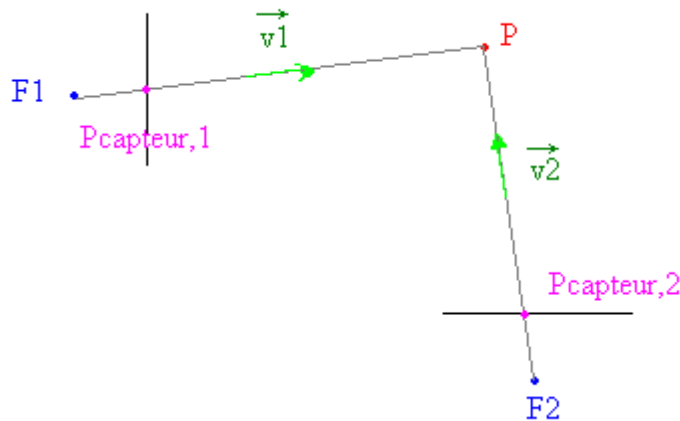


Figure V-11 : Détermination de la position du point P dans le référentiel spatial commun par le calcul de l'intersection des deux droites passant respectivement par le point focal F_1 et l'image du point P sur le capteur 1 et le point focal F_2 et l'image du point P sur le capteur 2.

En réalité, deux corrections doivent être apportées à cette approche.

La première est liée au fait que les lentilles fixées sur les caméras ne sont jamais parfaites. Elles déforment l'image enregistrée. Ainsi, comme le montre la Figure V-12, il peut y avoir une différence de quelques pixels entre la position de la projection de l'objet sur le capteur dans le cas d'une lentille parfaite ($P_{capteur}$) et la position réellement enregistrée (P_d). Cette déformation peut être modélisée par des équations polynomiales dont les paramètres doivent être déterminés expérimentalement.

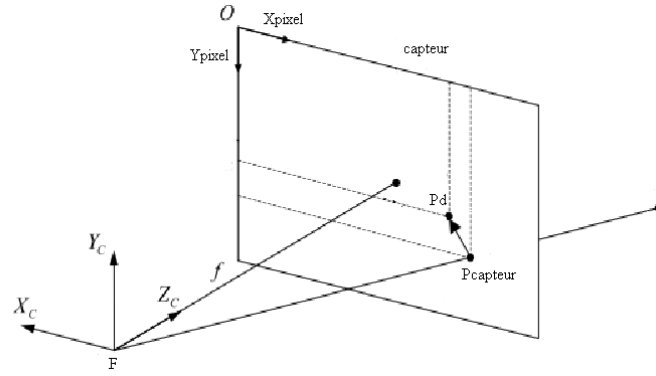


Figure V-12 : Déformation introduite par la lentille.

La seconde correction est liée au fait que les faisceaux lumineux traversent différents matériaux et subissent donc de la réfraction. Dès lors, comme le montre la Figure V-13, le postulat n'est strictement correct qu'entre le point focal de la caméra, la position corrigée de l'image de l'objet sur le capteur (P_{capteur}) et la position de son image sur la face externe de l'aquarium (P_{aq}). Il faut donc, pour déterminer la position de l'objet dans le repère spatial commun, corriger l'orientation et la position des deux droites avant de calculer leur intersection. Ces corrections sont effectuées en appliquant les lois de Snell-Descartes, ce qui implique de connaître la nature des matériaux constituant l'aquarium et la cuve ainsi que leur géométrie et leur position dans le référentiel spatial choisi.

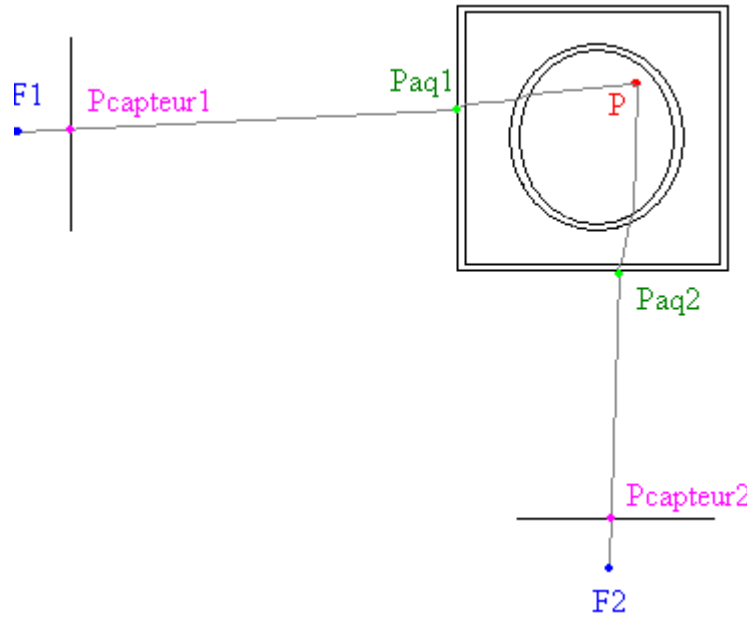


Figure V-13 : Réfraction des faisceaux lumineux à travers les différents matériaux.

2.3.2 Modélisation des caméras

Cette étape sert à élaborer *in fine* une fonction mathématique qui relie les coordonnées $(x_{\text{pixel}}, y_{\text{pixel}})_{\text{cam1 ou cam2}}$ de chacun des pixels du capteur d'une caméra aux coordonnées $(X_{\text{aq}}, Y_{\text{aq}}, Z_{\text{aq}})$, dans le référentiel commun, du point P_{aq} appartenant à la face externe de l'aquarium et qui correspond à ce pixel. A chaque caméra correspondra évidemment la face externe de l'aquarium qui lui fait face.

Pour arriver à ce résultat, chaque caméra est dans une première étape modélisée séparément (étapes 1a à 1c) par un modèle de type pinhole. Leurs positions respectives dans le repère spatial commun sont ensuite établies (Étapes 2a à 2c).

a) Etape 1a : Établissement des équations de base

Deux référentiels doivent tout d'abord être définis (Figure V-14). Le premier (en bleu) est le référentiel 2D associé à l'image. Les coordonnées sont exprimées en pixels et l'origine du repère est située dans le coin supérieur gauche de l'image. Le deuxième repère (en rouge) est un repère spatial associé à la caméra. Son origine, O_c , est située sur le point focal de la caméra. Ses axes \vec{x} et \vec{y} sont parallèles au plan correspondant au capteur de la caméra. Son axe \vec{z} coupe le plan du capteur au niveau du pixel dont les coordonnées sont (cc_x, cc_y) dans le repère 2D fixé à l'image. Dans l'espace tridimensionnel, ce point a comme coordonnées $(0,0,f)$ où f est la distance focale de la caméra qui correspond à la distance, exprimée en m, qui sépare le point focal du plan du capteur.

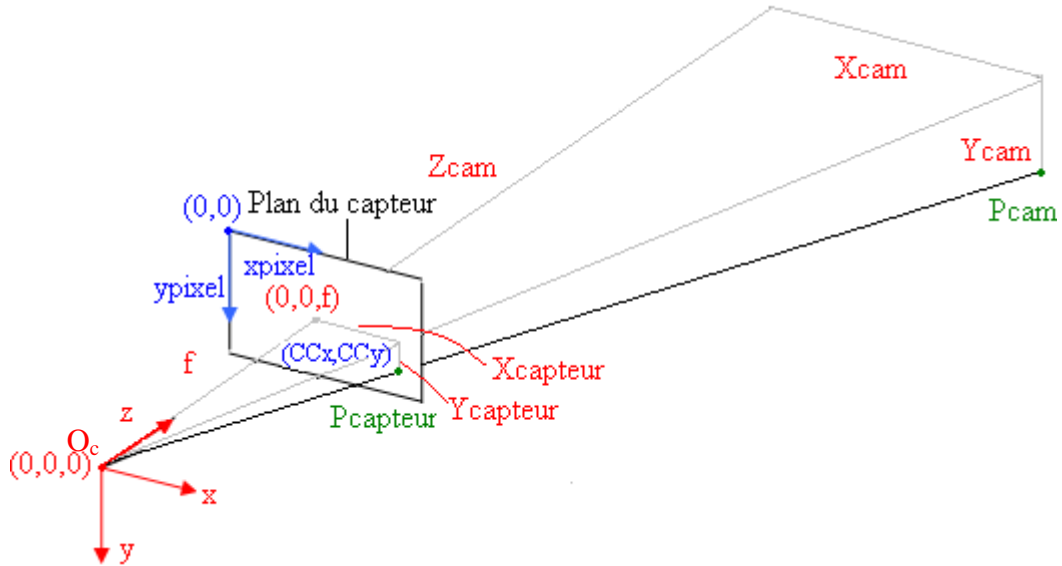


Figure V-14 : Illustration des liens géométriques qui existent entre la position d'un point P de coordonnées $(X_{cam}, Y_{cam}, Z_{cam})$, son image sur le capteur de la caméra de coordonnées $(X_{capteur}, Y_{capteur}, f)$ et ses coordonnées dans l'image (x_{pixel}, y_{pixel}) .

Si la lentille des caméras était parfaite, la position d'un point P de coordonnées $(X_{cam}, Y_{cam}, Z_{cam})$, la position de son image $P_{capteur}$ sur le plan du capteur de coordonnées $(X_{capteur}, Y_{capteur}, f)$ et la position du point focal de coordonnées $(0,0,0)$ seraient alignées. Leurs coordonnées spatiales seraient donc liées par la relation géométrique suivante :

$$\frac{X_{capteur}}{X_{cam}} = \frac{Y_{capteur}}{Y_{cam}} = \frac{f}{Z_{cam}} \quad (V-8)$$

Dans le plan du capteur, la relation mathématique qui relie les coordonnées spatiales du point $P_{capteur}$ à sa position exprimées en pixels dans le repère 2D image est :

$$\begin{aligned} x_{pixel} &= X_{capteur} / m_x + cc_x \\ y_{pixel} &= Y_{capteur} / m_y + cc_y \end{aligned} \quad (V-9)$$

où m_x et m_y sont des facteurs de conversion entre les unités métriques et les unités pixels. Il s'agit, en fait, de la taille réelle, exprimée en m, d'un pixel sur le capteur CMOS, égale à 7.4 μm pour les capteurs des caméras Falcon 4M60.

La mise en commun des Relations V-8 et V-9 permet d'établir la relation mathématique qui relie la position d'un point P (X_{cam} , Y_{cam} , Z_{cam}) à sa position dans l'image (x_{pixel} , y_{pixel}) :

$$\begin{aligned} x_{pixel} &= \frac{X_{cam}}{Z_{cam}} \frac{f}{m_x} + cc_x \\ y_{pixel} &= \frac{Y_{cam}}{Z_{cam}} \frac{f}{m_y} + cc_y \end{aligned} \quad (V-10)$$

En fait, c'est la relation réciproque qui nous intéresse puisque nous connaissons la position de la particule dans l'image et nous voulons en déduire sa position dans l'espace :

$$\begin{aligned} \frac{X_{cam}}{Z_{cam}} &= x_n = (x_{pixel} - cc_x) \frac{m_x}{f} \\ \frac{Y_{cam}}{Z_{cam}} &= y_n = (y_{pixel} - cc_y) \frac{m_y}{f} \end{aligned} \quad (V-11)$$

L'utilisation de cette relation implique que les valeurs numériques de cc_x , cc_y , f , m_x et m_y soient connues. Cependant, elle ne permet pas de déterminer univoquement les coordonnées du point P (X_{cam} , Y_{cam} , Z_{cam}) car elle est valable pour tous les points situés le long de la droite noire sur la Figure V-14. L'obtention d'un résultat unique nécessite une information complémentaire sur la position du point P . En l'absence de cette information, les coordonnées peuvent être exprimées sous forme de *ratio* X_{cam}/Z_{cam} et Y_{cam}/Z_{cam} correspondant à des coordonnées adimensionnelles x_n et y_n . Notons que le point P et le point $P_{capteur}$ ont les mêmes coordonnées adimensionnelles puisqu'ils appartiennent à la même droite.

En réalité, l'optique des caméras n'est pas parfaite, de sorte qu'elle introduit des distorsions dans les images enregistrées. Ces distorsions sont de deux natures : une distorsion radiale introduite par la forme même de la lentille et une distorsion tangentielle provenant d'un mauvais centrage de l'optique sur le capteur de la caméra. La Figure V-15 permet de visualiser ces distorsions.

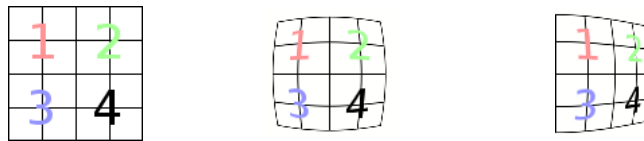


Figure V-15 : (gauche) image non déformée, (milieu) image ayant subi de la déformation radiale, (droite) image ayant subi de la déformation radiale et tangentielle.

Il en résulte que le point P apparaît sur le capteur de la caméra à la position déformée P_d caractérisée par les coordonnées adimensionnelles (x_d , y_d) plutôt qu'à la position idéale $P_{capteur}$ (Figure V-12). L'application directe des Relations V-11 pour convertir les coordonnées (x_{pixel} , y_{pixel}) conduit aux coordonnées de la position déformée (x_d , y_d) et non à celles de la position idéale (x_n , y_n). Pour corriger cela, il faut donc établir une relation qui donne les coordonnées adimensionnelles (x_n , y_n) du point P ou de sa projection corrigée $P_{capteur}$ en fonction des

coordonnées adimensionnelles (x_d, y_d) de sa projection déformée P_d . D'après Brown (1966), la réciproque de la relation qui nous intéresse peut s'écrire de la manière suivante :

$$\begin{bmatrix} x_d \\ y_d \end{bmatrix} = (1 + k_1(x_n^2 + y_n^2) + k_2(x_n^2 + y_n^2)^2) \begin{bmatrix} x_n \\ y_n \end{bmatrix} + \begin{bmatrix} 2k_3x_ny_n + k_4(y_n^2 + 3x_n^2) \\ 2k_4x_ny_n + k_3(3y_n^2 + x_n^2) \end{bmatrix} \quad (V-12)$$

où k_1 , k_2 , k_3 et k_4 sont les coefficients du modèle de distorsion.

Le premier terme du second membre modélise les distorsions radiales tandis que le second terme modélise les distorsions tangentielles. La réciproque de la Relation V-12 ne peut pas être calculée analytiquement et les valeurs du couple (x_n, y_n) doivent être estimées numériquement à partir des valeurs de (x_d, y_d) .

Ainsi en synthèse, connaissant les coordonnées (x_{pixel}, y_{pixel}) d'un objet dans l'image d'une caméra, il est possible de calculer ses coordonnées adimensionnelles (x_n, y_n) dans le référentiel de la caméra, en appliquant les Relations V-11 et V-12. Ces coordonnées adimensionnelles, qui correspondent à une droite de l'espace, pourront conduire aux coordonnées spatiales d'un point unique $(X_{cam}, Y_{cam}, Z_{cam})$ si on dispose d'une information supplémentaire relative à la position du point P dans le repère de la caméra. Il peut s'agir par exemple de l'appartenance à un plan dont l'équation est connue.

b) Etape 1b : Détermination des huit paramètres intrinsèques du modèle pinhole

Le modèle pinhole contient donc huit paramètres ($f_x=(f/m_x)$, $f_y=(f/m_y)$, cc_x , cc_y , k_1 , k_2 , k_3 et k_4). Ces paramètres sont qualifiés d'intrinsèques car ils sont uniquement liés à la nature de la caméra et à son optique et ils sont indépendants de la manière dont la caméra est orientée par rapport à la scène qu'elle observe. La détermination des valeurs des huit paramètres du modèle, indispensables à son utilisation, est réalisée grâce à une calibration et à un traitement des données résultantes à l'aide des codes Matlab® (v.R2010.a) élaborés et fournis en « Open Source » par J.Y. Bouguet, de la California Institute of Technology.

La calibration consiste à enregistrer une quarantaine d'images d'une mire plane composée d'une alternance de carrés blancs et de carrés noirs de 18.5 mm de côté (Figure V-16). Sur chacune des images, la mire est placée d'une manière différente et ses positions successives couvrent le volume occupé par l'aquarium (qui a été préalablement retiré de la table en aluminium).

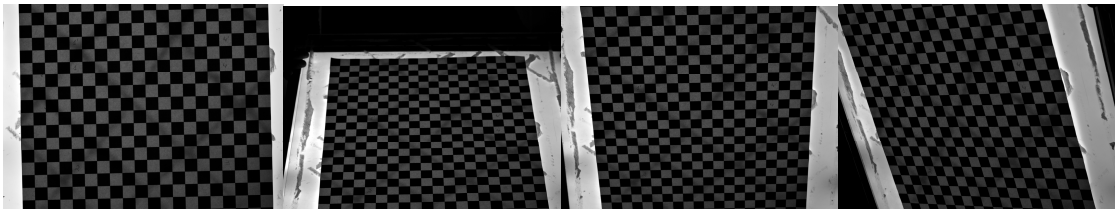


Figure V-16 : Images de la mire en damier placée de différentes manières.

La première étape du traitement des images consiste à encoder les caractéristiques géométriques de la mire c'est-à-dire la taille de chaque carré ainsi que leur nombre.

La seconde étape consiste à relever, sur les images, les coordonnées, exprimées en pixels, des sommets des carrés composant la mire qui sont visibles sur l'image. Entre 200 et 300 points sont ainsi repérés par image.

Lors de la troisième étape, une première estimation des valeurs de f_x , f_y , cc_x , cc_y est réalisée en faisant l'hypothèse que la lentille n'introduit pas de déformations (c'est-à-dire en posant $k_1, k_2, k_3, k_4=0$). A cette étape, c'est en fait dix paramètres par image qui sont optimisés par la méthode des moindres carrés à partir de 200 à 300 données. Ces dix paramètres sont les quatre paramètres intrinsèques et six paramètres dits « extrinsèques » et qui définissent l'équation du plan de la mire dans le repère spatial de la caméra. Ils sont calculés en tenant compte du fait que les sommets des carrés sont espacés de 18.5 mm et qu'ils sont alignés selon des droites qui se coupent à angle droit. Ces six paramètres correspondent en fait aux trois coordonnées du vecteur normal au plan et aux trois coordonnées d'un point appartenant à ce plan. Ils définissent donc de manière univoque l'équation du plan de la mire.

La dernière étape du traitement est une optimisation non linéaire et itérative qui détermine par la méthode des moindres carrés les huit paramètres intrinsèques et les $6 \times (\text{nombre d'images}) \approx 240$ paramètres extrinsèques.

Les paramètres intrinsèques f_x , f_y , cc_x , cc_y obtenus pour les deux caméras sont résumés dans le Tableau V-2. Les déformations introduites par les lentilles sont illustrées à la Figure V-17.

Tableau V-2 : Paramètres intrinsèques des deux caméras obtenus par calibration.

Caméra 1			Caméra 2		
$f_x=f/m_x$ f	8457.67 pixels ≈ 62 mm	± 8.00 pixels	$f_x=f/m_x$ f	8463.09 pixels ≈ 62 mm	± 7.85 pixels
$f_y=f/m_y$ f	8474.41 pixels ≈ 62 mm	± 8.07 pixels	$f_y=f/m_y$ f	8483.76 pixels ≈ 62 mm	± 8.08 pixels
cc_x	1264.20 pixels	± 13.39 pixels	cc_x	1157.75 pixels	± 12.69 pixels
cc_y	914.75 pixels	± 12.57 pixels	cc_y	843.61 pixels	± 13.19 pixels
erreur	en x : 0.46 pixels	en y : 0.50 pixels	erreur	en x : 0.45 pixels	en y : 0.56 pixels

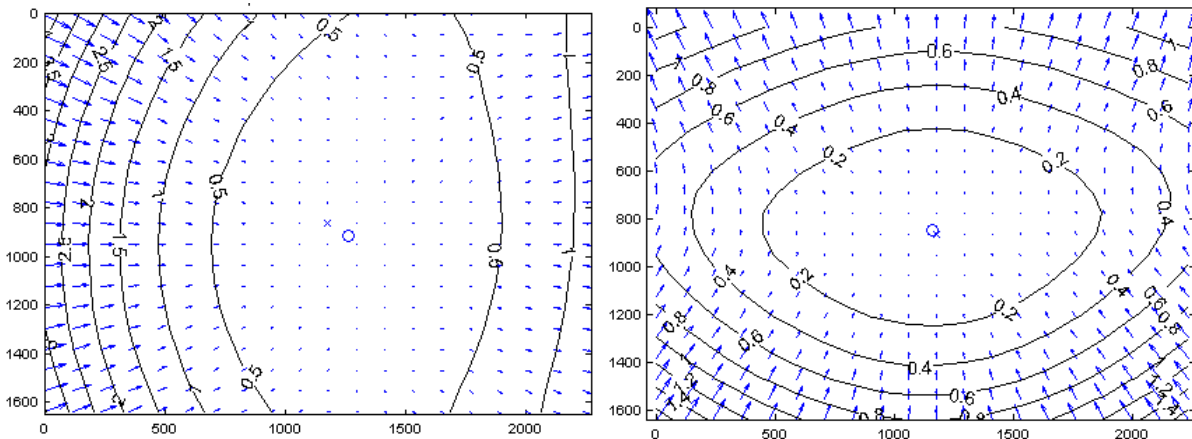


Figure V-17 : Déformations introduites par l'optique des caméras. Elles sont exprimées en pixels et représentées en valeur par les lignes de niveaux et en orientation par les flèches bleues.

Gauche : caméra 1, Droite : caméra2.

Il apparaît que la distance focale obtenue par calibration, égale à 62 mm, coïncide bien avec les valeurs déduites du réglage des optiques des caméras. En effet, l'objectif de la caméra a une distance focale de 60 mm. Il est monté sur une bague de mise au point qui peut balayer

une distance allant de 0 à +25 mm. Les coordonnées du point central, cc_x et cc_y (symbole « o » dans la Figure V-17) sont assez éloignées de celles du centre de l'image ($2352/2=1176$ pixels et $1178/2=589$ pixels, symbole « x » dans la Figure V-17). La déformation principale est donc de la déformation tangentielle. Ces déformations restent cependant relativement faibles. Elles valent au maximum 3.5 pixels pour la caméra 1 et 1.4 pixels pour la caméra 2.

c) Etape 1c : Détermination de l'équation du plan correspondant à la face externe de l'aquarium dans le repère de la caméra.

Si on connaît l'équation du plan de la face externe de l'aquarium dans le référentiel de la caméra correspondante, on pourra déterminer les coordonnées spatiales des points P (X_{cam} , Y_{cam} , Z_{cam}) appartenant à la face externe de l'aquarium et correspondant à chaque pixel de l'image et à chaque couple de coordonnées adimensionnelles (x_n , y_n).

Pour déterminer les équations des plans des faces externes de l'aquarium qui font face à chaque caméra, une mire en papier a été successivement collée sur ces deux faces. L'image de cette mire est enregistrée et traitée à l'aide des mêmes routines Matlab[®] que dans l'étape 1b. Les paramètres intrinsèques du modèle étant déterminés, les routines sont utilisées ici pour déterminer les six paramètres extrinsèques correspondant à l'équation du plan.

Les équations des plans des faces externes de l'aquarium dans les référentiels de leur caméra respectives sont :

$$\begin{aligned} \text{Caméra 1: } 0.0235 x + 0.0033 y - 0.9997 z + 1540.2613 &= 0 \\ \text{Caméra 2: } -0.0207 x - 0.0012 y - 0.9998 z + 1535.8155 &= 0 \end{aligned} \quad (V-13)$$

Grâce à ces équations, il est possible de calculer, pour chaque pixel de l'image caractérisé par les coordonnées adimensionnelles (x_n , y_n), les coordonnées du point correspondant appartenant à la face externe de l'aquarium en faisant le calcul de l'intersection des droites passant par ces pixels avec ce plan.

L'équation de la droite passant par l'origine du repère (0,0,0) de la caméra et par le point de coordonnées (X_{cam} , Y_{cam} , Z_{cam}) peut s'écrire sous la forme paramétrique suivante :

$$\begin{aligned} x &= 0 + (X_{cam} - 0)l & x &= X_{cam} (Z_{cam} / Z_{cam})l & x &= x_n l' \\ y &= 0 + (Y_{cam} - 0)l & \Rightarrow y &= Y_{cam} (Z_{cam} / Z_{cam})l & \Rightarrow y &= y_n l' \\ z &= 0 + (Z_{cam} - 0)l & z &= Z_{cam} (Z_{cam} / Z_{cam})l & z &= 1l' \end{aligned} \quad (V-14)$$

avec $l' = l Z_{cam}$

Dès lors, en substituant les Equations V-14 dans l'Equation V-13 du plan, on obtient la valeur de l' en résolvant l'équation linéaire ainsi obtenue. Connaissant l' , on obtient les valeurs de x , y , et z correspondant aux coordonnées spatiales du point P qui appartient à l'aquarium et qui a comme coordonnée adimensionnelle (x_n , y_n). Ce calcul est répété pour tous les pixels de l'image.

d) Etape 2a : Détermination de la position des référentiels des caméras dans le référentiel spatial commun.

A l'étape précédente, les coordonnées spatiales des points P appartenant aux deux faces externes de l'aquarium sont obtenues dans le référentiel spatial associé à la caméra 1 ou à la caméra 2. A ce stade, la manière dont ces deux référentiels sont positionnés dans l'espace

l'un vis-à-vis de l'autre est inconnue. La manière dont ils sont positionnés par rapport au repère spatial commun défini au Point 2.3.1 (Figure V-10) l'est tout autant. L'objectif de cette deuxième étape est donc de déterminer la position relative des trois repères dans l'espace afin d'élaborer une fonction mathématique qui permet de transformer les coordonnées des points P obtenus dans le référentiel de chaque caméra en leurs coordonnées dans le référentiel spatial commun.

Commençons par établir la formule générale qui permet d'exprimer les coordonnées d'un point P dans un référentiel spatial 2 lorsqu'elles sont connues dans un référentiel spatial 1 (Figure V-18). Géométriquement, ces deux repères sont liés par un vecteur de translation T et une matrice de rotation R . Le vecteur de translation T correspond à la position de l'origine O_1 du repère 1 exprimée dans le repère spatial 2. La matrice de rotation R indique quelle rotation il faut appliquer sur les axes $\vec{x}_1, \vec{y}_1, \vec{z}_1$ du repère spatial 1 pour les faire coïncider avec les axes $\vec{x}_2, \vec{y}_2, \vec{z}_2$ du repère spatial 2. Ainsi, si $P_1=(X_1, Y_1, Z_1)$ correspond aux coordonnées du point P dans le repère spatiale 1 et $P_2=(X_2, Y_2, Z_2)$ sont ses coordonnées dans le repère spatiale 2, elles sont liées par la relation :

$$P_2 = R \times P_1 + T \quad (V-15)$$

Dans le cas qui nous intéresse, le repère spatial 1 est le repère associé à une des caméras et le repère spatial 2 est le repère spatial commun. Il va donc falloir déterminer pour les deux couples de repères le vecteur de translation et la matrice de rotation qui les relient.

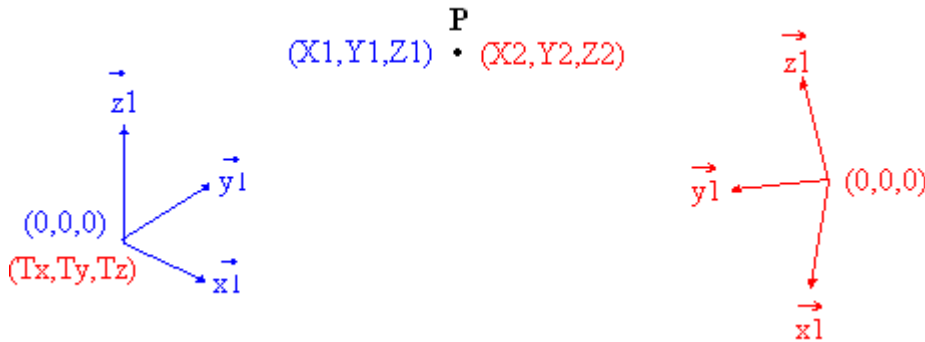


Figure V-18 : Position relative de deux repères spatiaux.

e) Etape 2b : vecteur T et matrice R qui relient le référentiel spatial de la caméra 2 au référentiel spatial commun

Les axes \vec{x} et \vec{y} du référentiel commun sont coplanaires avec le plan de la face externe de l'aquarium vue par la caméra 2. Les paramètres extrinsèques de ce plan dans le repère de la caméra 2 ont été déterminés expérimentalement à l'étape 1c. Les paramètres extrinsèques de ce plan, *i.e.* les trois composantes de son vecteur normal et les coordonnées d'un de ses points, peuvent également être exprimés sous la forme d'un vecteur de translation T_{plan} et d'une matrice R_{plan} de rotation qui indiquent la position du repère associé au plan dans le repère associé à la caméra 2. L'orientation du repère associé au plan est montrée dans la Figure V-19. Si la mire est collée sur la face de l'aquarium de telle manière que ses lignes

verticales soient parallèles aux arrêtes verticales de l'aquarium, les axes \vec{x} et \vec{y} du référentiel associés au plan sont parallèles aux axes \vec{x} et \vec{y} du référentiel commun (Figure V-20). Leurs origines appartiennent toutes les deux au plan de la face de l'aquarium et la distance qui les sépare peut être mesurée.

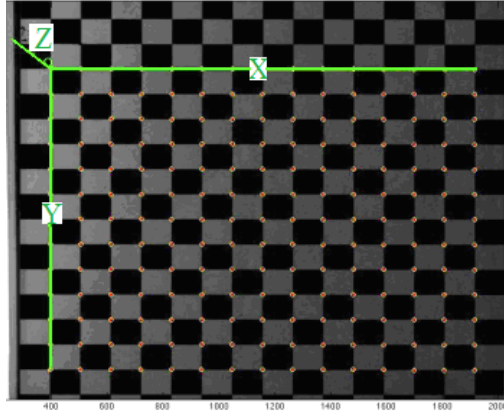


Figure V-19 : Référentiel associé à la mire.

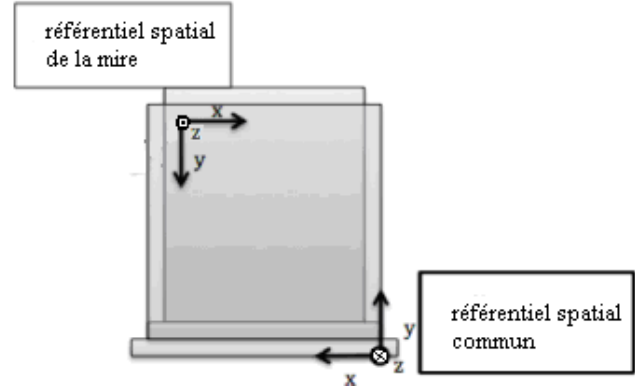


Figure V-20 : Position relative du repère spatial associé à la mire et du repère spatial commun.

Trois référentiels spatiaux sont ainsi définis. Les coordonnées d'un point P situé dans l'espace peuvent être exprimées dans ces trois référentiels : soit dans le référentiel associé à la caméra 2, $P_{cam2} = (X_{cam2}, Y_{cam2}, Z_{cam2})$, soit dans le référentiel associé au plan de la mire $P_{plan} = (X_{plan}, Y_{plan}, Z_{plan})$, soit dans le référentiel spatial commun, $P_{aq} = (X_{aq}, Y_{aq}, Z_{aq})$.

Suivant la Relation V-15, les coordonnées dans le référentiel commun d'un point P dont les coordonnées dans le référentiel de la caméra 2 sont connues, peuvent être calculées en appliquant les deux transformations suivantes :

- 1) Les coordonnées du point P dans le référentiel du plan de la mire se calculent à partir de ses coordonnées dans le référentiel de la caméra 2 par:

$$P_{plan} = R_{plan}^{-1} \times (P_{cam2} - T_{plan}) \quad (V-16)$$

où R_{plan} et T_{plan} expriment la position d'un repère associé au plan dans le repère associé à la caméra 2

- 2) Les coordonnées du point P dans le référentiel commun se calculent à partir de ses coordonnées dans le référentiel du plan par :

$$P_{aq} = (Q_y \times (Q_z \times P_{plan})) + T_{origine} \quad (V-17)$$

où Q_y et Q_z sont des matrices de rotation autour de l'axe \vec{z} et de l'axe \vec{y} qui permettent de superposer les axes du repère du plan de la mire sur les axes du repère spatial commun et où $T_{origine}$ est le vecteur de translation qui indique la position de l'origine du repère du plan de la mire dans le repère spatial commun.

f) Etape 2c : vecteur T et matrice R qui relie le référentiel spatial de la caméra 1 au référentiel spatial commun

Pour exprimer les coordonnées dans le référentiel de la caméra 2 d'un point P dont les coordonnées dans le référentiel de la caméra 1 sont connues, il faut déterminer la position du

repère de la caméra 1 par rapport au repère de la caméra 2. Il faut donc déterminer les matrices qui interviennent dans la relation :

$$P_{cam2} = (R_{cam1_cam2} \times P_{cam1}) + T_{cam1_cam2} \quad (V-18)$$

où T_{cam1_cam2} est le vecteur de translation qui indique la position de l'origine du repère de la caméra 1 dans le repère de la caméra 2 et R_{cam1_cam2} est la matrice de rotation qui indique la rotation à appliquer aux axes $\vec{x}_{cam1}, \vec{y}_{cam1}, \vec{z}_{cam1}$ du repère de la caméra 1 pour les faire coïncider avec les axes $\vec{x}_{cam2}, \vec{y}_{cam2}, \vec{z}_{cam2}$ du repère de la caméra 2.

Ensuite, les coordonnées du point P dans le référentiel commun seront obtenues en appliquant les Equations V-16 et V-17.

Pour déterminer les valeurs de la matrice de rotation R_{cam1_cam2} et le vecteur de translation T_{cam1_cam2} , une stéréo calibration est menée. La mire est placée dans une position où son quadrillage peut être vu de manière distincte par les deux caméras et une image est enregistrée par chaque caméra. Le traitement de ces images par les codes Matlab® de J.Y. Bouguet permet d'extraire les paramètres extrinsèques correspondant au plan de la mire pour chacune des caméras. On obtient ainsi deux vecteurs de translation (T_{cam1} , T_{cam2}) et deux matrices de rotation (R_{cam1} , R_{cam2}) qui expriment la position du repère fixé sur la mire dans les repères de la caméra 1 et de la caméra 2. Ainsi, si $P_{mire} = (X_{mire}, Y_{mire}, Z_{mire})$ sont les coordonnées du point P dans le référentiel de la mire, ses coordonnées dans le référentiel de la caméra 1 (P_{cam1}) et dans le référentiel de la caméra 2 (P_{cam2}) seront :

$$P_{cam1} = (R_{cam1} \times P_{mire}) + T_{cam1} \quad (V-19)$$

$$P_{cam2} = (R_{cam2} \times P_{mire}) + T_{cam2} \quad (V-20)$$

Si on élimine P_{mire} entre les Equations V-19 et V-20, on obtient la relation qui relie P_{cam2} à P_{cam1} , qui fait intervenir la matrice R_{cam1_cam2} et le vecteur T_{cam1_cam2} :

$$P_{cam2} = \underbrace{((R_{cam2} \times R_{cam1}^{-1}) \times P_{cam1})}_{R_{cam1_cam2}} + \underbrace{(T_{cam2} - R_{cam1}^{-1} \times T_{cam1})}_{T_{cam1_cam2}} \quad (V-21)$$

g) Etape 2d : synthèse des résultats obtenus

La Figure V-21 montre la position des différents éléments dans le repère spatial commun.

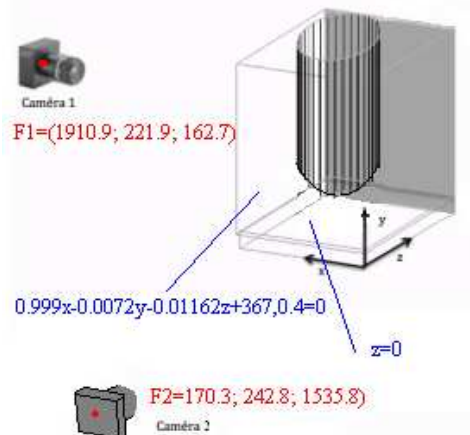


Figure V-21 : Position des différents éléments dans le repère spatial commun.

L'origine du repère de la caméra, qui correspond au point focal F_1 de cette caméra est situé au point de coordonnées (1910.9 mm ; 221.9 mm ; 162.7 mm) dans le repère commun. De même, le point focal F_2 de la caméra 2 est situé au point de coordonnées (170.3 mm ; 242.8 mm ; -1535.8 mm). Les plans correspondant aux deux faces de l'aquarium faisant face aux caméras ont pour équations dans le repère spatial commun :

$$\begin{aligned} \text{plan_aquarium_camera1} : 0.999x - 0.0072y - 0.0116z - 367.04 &= 0 \\ \text{plan_aquarium_camera2} : z &= 0 \end{aligned} \quad (\text{V-22})$$

Le diagramme ci-dessous synthétise l'ensemble des opérations réalisées pour établir, à partir du couple de pixels $(x_{\text{pixel}}, y_{\text{pixel}})_{\text{cam1 ou cam2}}$, les coordonnées du point P_{aq} correspondant dans le repère spatial commun

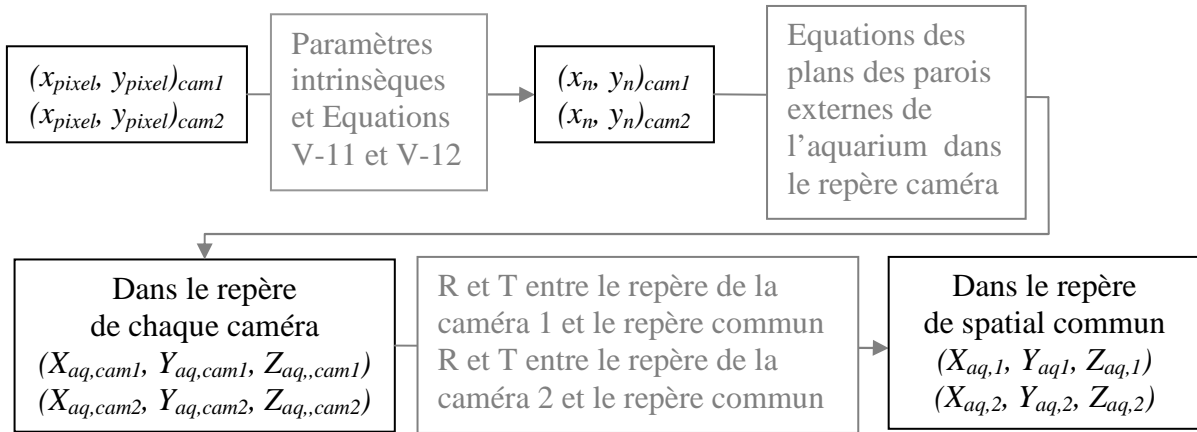


Figure V-22 : Opérations nécessaires pour établir la relation mathématique qui relie $(x_{\text{pixel}}, y_{\text{pixel}})_{\text{cam1 ou cam2}}$ aux coordonnées du point P_{aq} situé sur la paroi externe de l'aquarium dans le repère spatial commun.

En pratique, l'ensemble de ces calculs n'est réalisé qu'une fois pour chaque pixel de l'image. Les couples $(x_{\text{pixel}}, y_{\text{pixel}})_{\text{cam1 ou cam2}}$ et $(X_{aq,1ou2}, Y_{aq,1ou2}, Z_{aq,1ou2})$ sont stockés dans une fonction Matlab[®] auquel on fait appel lorsque l'on doit calculer la position du point P_{aq} correspondant au point de coordonnées $(x_{\text{pixel}}, y_{\text{pixel}})$. Cette fonction Matlab[®] reste valable tant que la caméra et l'aquarium ne sont pas déplacés.

2.3.3 Calculs des rayons réfractés

A chaque point $(x_{\text{pixels}}, y_{\text{pixel}})$ appartenant à une image acquise par une des deux caméras correspond un point appartenant à la face externe de l'aquarium. A partir des coordonnées de ce point $P_{aq,1,2}$ et de celles du point focal de la caméra correspondante (F_1 ou F_2), on peut écrire l'équation paramétrique du faisceau lumineux rectiligne qui relie ces points :

$$\begin{aligned} x &= F_{X,1} + (X_{aq,1} - F_{X,1})l = F_{X,1} + v_{x,1}l & x &= F_{X,2} + (X_{aq,2} - F_{X,2})l = F_{X,2} + v_{x,2}l \\ y &= F_{Y,1} + (Y_{aq,1} - F_{Y,1})l = F_{Y,1} + v_{y,1}l & y &= F_{Y,2} + (Y_{aq,2} - F_{Y,2})l = F_{Y,2} + v_{y,2}l \\ z &= F_{Z,1} + (Z_{aq,1} - F_{Z,1})l = F_{Z,1} + v_{z,1}l & z &= F_{Z,2} + (Z_{aq,2} - F_{Z,2})l = F_{Z,2} + v_{z,2}l \end{aligned} \quad (\text{V-23})$$

où $\vec{v}_{1,2} = (v_{x,1,2}, v_{y,1,2}, v_{z,1,2})$ est le vecteur directeur du faisceau lumineux rectiligne dans le repère commun.

Ces faisceaux vont cependant changer d'orientation lorsqu'ils vont traverser les différents matériaux qui composent l'aquarium et la cuve car ils subiront de la réfraction. Pour calculer leur nouvelle orientation, les lois de Snell Descartes sont employées. Il faut utiliser leur expression en notation vectorielle car on les emploie dans un espace tridimensionnel.

Soit $\theta_{incident}$, l'angle incident existant entre le rayon incident d'orientation $\vec{v}_{incident} = (v_{incident,X}, v_{incident,Y}, v_{incident,Z})$ et la normale locale $\vec{n} = (n_x, n_y, n_z)$ à la courbe correspondant à l'interface entre les deux matériaux d'indice de réfraction respectif n_a, n_b . Soit $\theta_{réfracté}$, l'angle réfracté existant entre le rayon réfracté d'orientation $\vec{v}_{réfracté} = (v_{réfracté,X}, v_{réfracté,Y}, v_{réfracté,Z})$ et la normale locale \vec{n} . Ces grandeurs sont liées par les équations vectorielles suivantes dans lesquelles tous les vecteurs ont préalablement été normés :

$$\cos \theta_{incident} = \vec{n} \bullet (-\vec{v}_{incident}) = n_x v_{incident,X} + n_y v_{incident,Y} + n_z v_{incident,Z} \quad (V-24)$$

$$\cos \theta_{réfracté} = \sqrt{1 - \left(\frac{n_a}{n_b}\right)^2 (1 - (\cos \theta_{incident})^2)} \quad (V-25)$$

$$\text{Si } \vec{n} \bullet (-\vec{v}_{incident}) > 0 : \vec{v}_{réfracté} = \left(\frac{n_a}{n_b}\right) \vec{v}_{incident} + \left(\frac{n_a}{n_b} \cos \theta_{incident} - \cos \theta_{réfracté}\right) \vec{n} \quad (V-26)$$

$$\text{Si } \vec{n} \bullet (-\vec{v}_{incident}) < 0 : \vec{v}_{réfracté} = \left(\frac{n_a}{n_b}\right) \vec{v}_{incident} + \left(\frac{n_a}{n_b} \cos \theta_{incident} + \cos \theta_{réfracté}\right) \vec{n} \quad (V-27)$$

Comme le montre le schéma de la Figure V-23, ces formules sont employées aux interfaces air - plexiglas ; plexiglas - eau ; eau - verre ; verre - solution de CaCl_2 . A chaque interface, la position du point d'intersection est déterminée (P_{aq1} ou 2 , P' , P'' , $P_{cuve,interne}$) dans le repère spatial commun, ainsi que l'orientation de la normale locale \vec{n} à l'interface et l'orientation du vecteur réfracté $\vec{v}_{réfracté}$. En appliquant cette méthodologie de proche en proche au niveau des différentes interfaces, on obtient la position du point $P_{cuve,interne}$ situé sur la face interne de la cuve en verre et l'orientation du rayon réfracté $\vec{v}_{réfracté,cuve_int\,erne}$ qui correspondent au faisceau lumineux incident passant par les points (F_1 , $P_{aq,1}$) ou (F_2 , $P_{aq,2}$) dans l'air et qui correspondent donc aux couples $(x_{pixels}, y_{pixels})_{cam1}$ ou $cam2$. Ici encore, les calculs ne sont réalisés qu'une seule fois pour une position donnée de la cuve et des caméras. Les couples $(x_{pixel}, y_{pixel})_{cam1}$ ou $cam2$ et $(P_{cuve,interne,1,2}, \vec{v}_{réfracté,cuve_int\,erne,1,2})$ sont stockés dans une fonction Matlab[®].

Ces calculs nécessitent de connaître les indices de réfraction des différents matériaux ainsi que leur géométrie et leur position dans le repère spatial commun.

Les indices de réfraction de l'air, de l'eau désionisée, du verre et du plexiglas ont été extraits de base de données (Kaybe et Laby). Ils valent respectivement 1, 1.33, 1.51 et 1.51. L'indice de réfraction de la solution de chlorure de calcium (4 % en masse) a été mesuré à l'aide d'un réfractomètre. Il vaut 1.34 à 20°C.

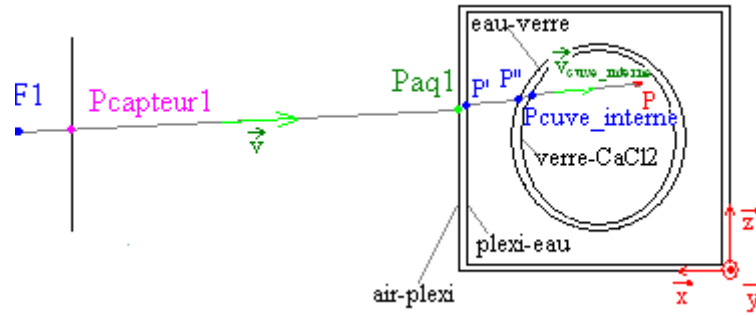


Figure V-23 : Réfraction à travers les différents matériaux qui composent la cuve et l'aquarium.

La géométrie et la position de l'aquarium sont facilement caractérisables. Ses faces externes et internes sont des plans parallèles espacés de 10 mm. Les équations des plans des faces externes ont été déterminées dans le référentiel spatial commun au Point 2.3.2.g. Les équations des plans des faces internes sont donc :

$$\begin{aligned} \text{plan_aquarium_camera1} : 0.999x - 0.0072y - 0.0116z - 357.04 &= 0 \\ \text{plan_aquarium_camera2} : z - 10 &= 0 \end{aligned} \quad (\text{V-28})$$

Pour la cuve en verre par contre, ces données sont moins facilement accessibles : sa géométrie est plus complexe et sa position exacte par rapport à l'aquarium n'est pas connue *a priori* et doit être déterminée expérimentalement.

Les caractéristiques géométriques de la cuve (forme et épaisseur de paroi) ont été mesurées sur base d'images de sections droites obtenues par tomographie à rayons X. (caractéristiques du dispositif disponible dans Toye *et al.*, 2005). Sur les images obtenues (Figure V-24), les parois internes et externes de la cuve apparaissent comme deux cercles concentriques. Ces images sont ensuite analysées pour déterminer les rayons des cercles correspondant à la face interne et à la face externe de la cuve dans les coupes correspondant chacune à une coordonnée y donnée. Notons qu'à ce stade, les coordonnées x, y, z utilisées sont relatives à un référentiel associé à la cuve. L'origine de ce repère est située au sommet de la cuve sur son axe de symétrie. L'axe \vec{y} est parallèle à cet axe de symétrie.

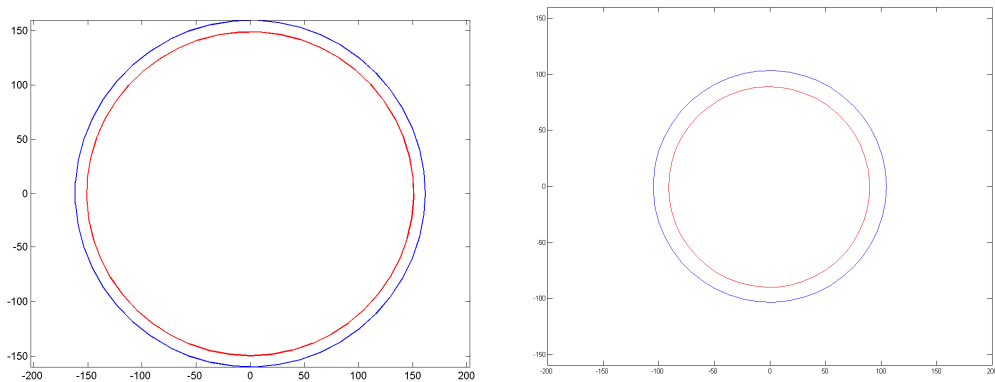


Figure V-24 : Coupe horizontale de la cuve obtenue à une hauteur $y = -159.6$ mm et $y = -446.6$ mm.

Les données ainsi obtenues servent de base pour élaborer un modèle géométrique de la cuve en deux parties (Figure V-25):

- 1) Une zone supérieure, composée de deux cylindres concentriques d'axe de symétrie vertical et de rayons respectifs égaux à 150.6 mm et 161.1 mm. L'épaisseur de la paroi de la cuve dans cette zone est donc de 10.5 mm.
- 2) Une calotte modélisée par deux ellipsoïdes concentriques (h,k,l) et de demi-axes a, b et c . Les valeurs de g, h, q, a, b et c intervenant dans les équations des ellipsoïdes, de la forme :

$$\frac{(x-g)^2}{a^2} + \frac{(y-h)^2}{b^2} + \frac{(z-q)^2}{c^2} = 1 \quad (V-29)$$

sont déterminées sur base des dimensions mesurées sur les images tomographiques. L'ajustement est réalisé en imposant que le centre des ellipsoïdes soit situé sur l'axe de symétrie des cylindres ($g=q=0$) et qu'il n'y ait pas de discontinuité dans l'orientation de la normale locale lorsque l'on passe de la zone cylindrique supérieure à la zone ellipsoïdale inférieure. Pour conserver une normale horizontale dans le plan de jonction, il faut que la partie inférieure soit un demi-ellipsoïde dont le plan médian horizontal est un cercle. On a donc $a = c = 150.6$ mm pour le demi-ellipsoïde interne et $a = c = 161.1$ mm pour le demi-ellipsoïde externe. Enfin, les valeurs de b et h sont déterminées en minimisant les écarts entre les points des surfaces théoriques et les points expérimentaux mesurés par tomographie. b vaut respectivement 128.4 mm et 135.5 mm pour les demi-ellipsoïdes correspondant à la face interne et à la face externe de la cuve, h vaut 339.12 mm. Le centre commun des demi-ellipsoïdes est donc situé à la coordonnée $(0 ; -339.1 ; 0)$ dans le repère de la cuve. La partie cylindrique s'étend donc de $y = 0$ à $y = -h$ et la partie ellipsoïdale de $y = -h$ à $y = -(h+b)$.

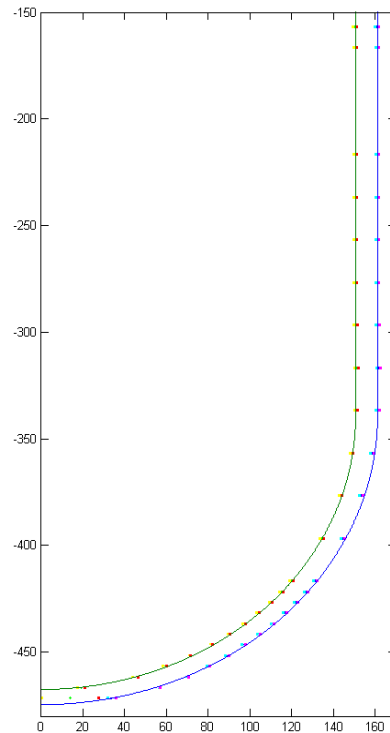


Figure V-25 : Comparaison du modèle géométrique de la cuve par rapport aux points expérimentaux obtenues par tomographie à rayons X.

La géométrie de la cuve ayant été modélisée, il ne reste plus qu'à positionner son repère dans le repère spatial commun. Un soin particulier a été apporté pour placer la cuve de telle manière que son axe de symétrie soit vertical et donc parallèle à l'axe \vec{y} du repère commun. La distance selon l'axe \vec{y} entre l'origine du repère de la cuve et l'origine du repère commun a été mesurée avec un pied à coulisse. Elle est égale à 543.4 mm.

Les coordonnées x et z de l'axe de symétrie dans le repère commun ont été déterminées de la manière suivante :

- Deux marques ont été faites à même hauteur sur la face externe de la cuve au niveau de sa partie cylindrique. Elles sont réalisées dans le quart de cuve situé entre les deux axes optiques des caméras de manière à ce qu'elles soient observées « directement » par chaque caméra, sans que les faisceaux lumineux ne doivent traverser la cuve avant de les atteindre ;
- Une image a été enregistrée par chaque caméra et les positions des deux marques ont été relevées dans les images enregistrées ;
- La fonction Matlab[®] développée pour tenir compte du phénomène de réfraction des faisceaux lumineux à travers les parois de l'aquarium a ensuite été utilisée, pour calculer la position des points appartenant à la face interne de la paroi de l'aquarium et l'orientation du faisceau réfracté qui correspondent à ces couples de pixels ;
- Pour chacune des marques, le point d'intersection des droites obtenues pour chacune des caméras correspond aux coordonnées spatiales de la marque dans le référentiel spatial commun. Dans un plan horizontal xz , les deux marques doivent appartenir à un même cercle d'équation :

$$(x - i)^2 + (z - j)^2 = 161.1^2 \quad (V-30)$$

qui correspond à une section horizontale de la paroi du cylindre externe. Les coordonnées (x, z) des deux marques dans le repère spatial commun permettent de déterminer les valeurs de i et j qui sont les coordonnées de l'axe de symétrie de la cuve dans le repère commun. Elles valent respectivement 186.4 mm et 179.6 mm.

2.4 Algorithme de tri et de construction des trajectoires

À ce stade, nous disposons pour chaque acquisition de trajectoire de deux fichiers txt (un par caméra) qui contiennent chacun un tableau où chaque ligne correspond à la position (x_{pixel}, y_{pixel}) d'un candidat sélectionné dans une image acquise au temps t . Ce candidat peut être ou non la particule. Nous disposons également de fonctions Matlab[®] qui permettent de déterminer pour tout point $(x_{pixel}, y_{pixel})_{cam1 \text{ ou } cam2}$ observé dans une image, les coordonnées dans le référentiel spatial commun du point situé sur la face interne de la cuve $P_{cuve,interne,1 \text{ ou } 2}$ correspondant à ce couple de pixels ainsi que l'orientation du faisceau lumineux réfracté $\vec{V}_{réfracté,cuve_interne,1 \text{ ou } 2}$ qui part de ce point et qui traverse la cuve. Ainsi, si on prend pour les deux images acquises au temps t deux candidats (un dans chaque fichier txt), on pourra déterminer la position (x, y, z) de l'objet correspondant aux deux candidats dans le référentiel

spatial commun par le calcul de l'intersection des deux droites. Il faut donc résoudre le système d'équations suivant où les inconnues sont x, y, z, l_1 et l_2

$$\begin{aligned} x &= P_{X,cuve_interne_1} + v_{x,refracté_cuve_interne_1} l_1 = P_{X,cuve_interne_2} + v_{x,refracté_cuve_interne_2} l_2 \\ y &= P_{Y,cuve_interne_1} + v_{y,refracté_cuve_interne_1} l_1 = P_{Y,cuve_interne_2} + v_{y,refracté_cuve_interne_2} l_2 \quad (V-31) \\ z &= P_{Z,cuve_interne_1} + v_{z,refracté_cuve_interne_1} l_1 = P_{Z,cuve_interne_2} + v_{z,refracté_cuve_interne_2} l_2 \end{aligned}$$

Ce système d'équations a une solution pour autant que les deux droites ne soient pas gauches.

Dans les deux fichiers txt enregistrés pour chaque acquisition de trajectoire, il y a en moyenne 140 candidats par pas de temps. Le but de l'algorithme de tri présenté ci-après est d'identifier le candidat qui correspond à la particule parmi ces 140 possibilités. Ce traitement est réalisé en 5 étapes qui ont chacune pour but d'éliminer un maximum de faux-candidats. Ces traitements ont été réalisés dans l'environnement Matlab[®]. Les deux fichiers txt sont donc ouverts dans Matlab[®] et respectivement enregistrés dans des matrices $M1$ et $M2$ qui contiennent chacune 3 colonnes (t, x_{pixel}, y_{pixel}) et quelques dizaines de millions de lignes.

Etape 1 : Elimination des points fixes

Dans les fichiers txt, il y a des couples de pixels qui apparaissent quasi à chaque pas de temps. Ces couples correspondent dans les images à une série d'éléments plus ou moins fixes comme, par exemple, des petites inclusions dans le verre de la cuve ou encore à des groupes de pixels qui sont situés à la périphérie des grandes zones noires apparaissant après seuillage au niveau du mobile, de son axe et le long des parois de la cuve (Figure V-7).

Les coordonnées (x_{pixel}, y_{pixel}) de ces points fixes peuvent être identifiées en se basant sur le fait que ces couples de coordonnées apparaissent anormalement souvent dans les matrices $M1$ et $M2$. Les lignes correspondant à ces couples sont ensuite supprimées des matrices $M1$ et $M2$. Ce traitement diminue significativement le nombre de candidats par pas de temps. Il passe, en effet, en moyenne, de 140 à 1.5 avec un maximum d'une dizaine de candidats par caméra pour un nombre limité de pas de temps.

Etape 2 : Mise en commun des deux matrices et élimination des combinaisons improbables

A cette étape, on combine les informations enregistrées par les deux caméras. En effet, si au pas de temps t , on a dans la matrice $M1$ les coordonnées (x_{pixel}, y_{pixel})_{cam1} de 3 candidats et dans la matrice $M2$ les coordonnées (x_{pixel}, y_{pixel})_{cam2} de 4 candidats, on devra créer 12 doublets [(x_{pixel}, y_{pixel})_{cam1}, (x_{pixel}, y_{pixel})_{cam2}]. Un seul d'entre eux correspond à la particule. On peut cependant à cette étape éliminer les doublets où les coordonnées $y_{pixel,cam1}$ et $y_{pixel,cam2}$ sont très différentes (>300 pixels). En effet, les deux caméras sont plus ou moins réglées à la même hauteur (à 20 pixels près, soit à peu près 3.5 mm de différence). Un doublet de candidats où le premier est situé dans le haut de l'image tandis que le second est situé dans le bas de l'image ne peut pas physiquement correspondre à un objet unique dans l'espace tridimensionnel.

Etape 3 : Passage dans le repère tridimensionnel et élimination des combinaisons improbables

En utilisant les fonctions Matlab[®] générées au Point 2.3, on peut transformer chaque doublet $[(x_{pixel}, y_{pixel})_{cam1}, (x_{pixel}, y_{pixel})_{cam2}]$ en un doublet $[P_{cuve,interne,1}, P_{cuve,interne,2}]$ et éliminer de nouveau les doublets dont les coordonnées $P_{Y,cuve_interne_1}$ et $P_{Y,cuve_interne_2}$ sont trop différentes. A cette étape, on peut être plus strict sur ce critère qu'à l'étape précédente car on connaît l'orientation $\vec{v}_{réfracté,cuve_interne,1ou2}$ des droites qui partent de ces points. On sait donc dans quelle gamme de valeurs varie la coordonnée P_y des points situés le long des deux segments de droite inscrits dans la cuve. Si les gammes de valeurs obtenues ne coïncident pas, ceci indique que les deux segments de droite sont gauches ou que les droites se couperont hors de la cuve.

Etape 4 : Détermination des coordonnées (x,y,z) du point P correspondant au doublet et élimination des points situés hors de la cuve

A cette étape, on résout pour chaque doublet le système d'Equations V-31 afin de déterminer les coordonnées (x,y,z) du point P correspondant. Les candidats qui donnent des points P situés hors de la cuve sont éliminés.

Etape 5 : Identification du candidat correspondant à la particule et construction de la trajectoire

A ce stade, il reste en moyenne 1.3 candidats par pas de temps avec un maximum d'une vingtaine de candidats pour quelques rares pas de temps. Pour déterminer si un des candidats est la particule, on va se baser sur des considérations cinématiques. En effet, la particule suit l'écoulement local. Sa vitesse instantanée entre deux pas de temps doit donc être comprise dans une certaine gamme qui peut être définie à l'aide des mesures P.I.V. réalisées au Chapitre III.

L'algorithme qui identifie la particule parmi les candidats est en deux parties imbriquées l'une dans l'autre. L'algorithme central repose sur le fait que l'on connaît la position de la particule au temps $t-1^2$. On détermine sa position au temps t et aux temps suivants sur base de différentes stratégies qui sont explicitées ci-après. Le problème est qu'au temps $t-1$ (en particulier au temps t_0) il est fort possible qu'on ait plusieurs candidats. La question se pose alors de savoir lequel correspond à la particule. L'algorithme « externe » permet de répondre à cette question en appliquant l'algorithme central à tous les candidats du temps $t-1$. Sur base des résultats obtenus, un choix est ensuite fait.

² Dans les expressions $t+1, t+2...t+i$, l'indice i fait référence non pas à un temps en secondes mais au nombre d'images qui séparent les deux temps. Sachant qu'on acquiert une image tous les $1/60^{\text{ème}}$ de secondes,

formellement il faudrait écrire : $t, t+\frac{1}{60}s, t+\frac{2}{60}s, \dots, t+\frac{i}{60}s$. Mais ceci alourdit fortement les notations.

A) Algorithme central

Trois stratégies, plus une variante, sont utilisées dans l'algorithme central. Définissons trois grandeurs : k , r , w qui sont le nombre de pas de temps ($1/60^{\text{ème}}$ de seconde) qui séparent le temps où la position de la particule a été identifiée respectivement pour la dernière fois, l'avant dernière fois, l'antépénultième fois par rapport au temps t où on cherche à l'identifier.

1^{ère} stratégie : algorithme du plus proche voisin : $1 \leq k < 5$, $r > k+4$

Cet algorithme est employé lorsque k est compris entre 1 et 5 et que r est supérieur à $k+4$. Dans ce cas, on considère que l'on est dans la situation où la dernière position connue de la particule est assez proche dans le temps de celle qu'on tente de déterminer (temps t). Par contre, l'avant dernière position, et *a fortiori* les précédentes, sont trop éloignées dans le temps que pour fournir une information exploitable dans le calcul. Pour sélectionner le candidat correspondant à la particule au temps t , on a donc une seule information qui est la dernière position connue de la particule au temps $t-k$. Cependant, comme ces deux temps sont très proches, il est probable que la particule ne se soit pas déplacée très loin et que les deux positions correspondant au temps $t-k$ et t soient très proches aussi. On va donc sélectionner le candidat au temps t qui est le plus proche de la dernière position connue au temps $t-k$ pour autant que la vitesse moyenne de la particule calculée entre $t-k$ et t ne dépasse pas une vitesse maximale estimée sur base des mesures P.I.V.. Si cette condition n'est pas respectée, aucun candidat n'est sélectionné au temps t et l'algorithme est alors appliqué aux candidats correspondant au temps $t+1$.

2^{ème} stratégie : algorithme du plus proche voisin par rapport à la position estimée de la particule au temps t grâce à une estimation de sa vitesse instantanée : $1 \leq k < 10$, $r \leq k+4$, $w > r+3$

Cet algorithme est employé lorsque k est compris entre 1 et 10 et que r est compris entre $k+1$ et $k+4$ mais que w est supérieur à $r+3$. Dans ce cas, on dispose donc la position de la particule aux temps $t-k$ et $t-r$ pour estimer sa position au temps t . Ces deux positions permettent de calculer une vitesse moyenne de la particule entre les temps $t-k$ et $t-r$ et donc d'estimer la position de la particule au temps t par la formule :

$$P_{t, \text{estimé}} = P_{t-k} + v_{\text{estimé}} \Delta t \quad (\text{V-32})$$

Avec $v_{\text{estimé}} = \left(\frac{P_{t-k} - P_{t-r}}{(k-r)(1/60)} \right)$ et $\Delta t = k(1/60)$.

Parmi les candidats du temps t , on sélectionne celui dont la position est la plus proche de cette position $P_{t, \text{estimé}}$ et qui vérifie également les deux conditions suivantes : la vitesse moyenne calculée entre $t-k$ et t ne dépasse pas la vitesse maximale autorisée et elle ne diffère pas trop non plus de la vitesse moyenne estimée entre $t-k$ et $t-r$. Si ces conditions ne sont pas respectées, aucun candidat n'est sélectionné au temps t . L'algorithme correspondant à cette stratégie ou la 1^{ère} stratégie est alors appliqué aux candidats correspondant au temps $t+1$.

3^{ème} stratégie : algorithme du plus proche voisin par rapport à la position estimée de la particule au temps t grâce à une estimation de sa vitesse instantanée et de son accélération moyenne: $1 \leq k < 10, r \leq k+4, w \leq r+3$

Cet algorithme est employé lorsque k est compris entre 1 et 10 et que r est compris entre $k+1$ et $k+4$ et que w est compris entre $r+1$ et $r+3$. Dans ce cas, on dispose de la position de la particule aux temps $t-k$, $t-r$ et $t-w$ pour estimer la position de la particule au temps t . Ces trois positions permettent de calculer deux vitesses moyennes entre les temps $t-k$ et $t-r$ et les temps $t-r$ et $t-w$ et donc d'estimer une accélération moyenne entre les temps $t-k$ et $t-r$. La position de la particule au temps t peut donc être estimée d'une manière un peu plus fine, par rapport à la stratégie précédente, en appliquant la formule :

$$P_{t,estimé} = P_{t-k} + v_{estimé} \Delta t + \frac{1}{2} a_{estimé} \Delta t^2 \quad (V-33)$$

$$\text{Avec } v_{estimé} = \left(\frac{P_{t-k} - P_{t-r}}{(k-r)(1/60)} \right), \Delta t = k(1/60) \text{ et } a_{estimé} = \left[\frac{\left(\frac{P_{t-k} - P_{t-r}}{(k-r)(1/60)} \right) - \left(\frac{P_{t-r} - P_{t-w}}{(r-w)(1/60)} \right)}{(k-r)(1/60)} \right]$$

Parmi les candidats du temps t , on sélectionne celui dont la position est la plus proche de cette position $P_{t,estimé}$ et qui vérifie de nouveau les deux conditions sur sa vitesse moyenne. Si ces conditions ne sont pas respectées, aucun candidat n'est sélectionné au temps t . L'algorithme correspondant à cette stratégie, la 2^{ème} stratégie ou la 1^{ère} stratégie sont alors appliqués aux candidats correspondant au temps $t+1$.

La variante des 3 stratégies :

Dans le cas particulier où k est compris entre 2 et 5 et que l'on trouve une correspondance au temps t , on interpole linéairement la position de la particule aux temps compris entre $t-k$ et t sur base des positions connues à ces deux temps.

Notons que les limites sur les valeurs de k , r , et w qui définissent quel algorithme est appliqué ont été choisies en se basant sur un certain bon sens connaissant une approximation de la vitesse maximale de la particule dans la cuve et donc la distance maximale qu'elle peut parcourir pour chaque intervalle de temps.

B) Algorithme externe

Cet algorithme sert à identifier la particule parmi les candidats au temps t_0 mais également à tous les temps t où on est sorti des conditions sur k , r et w de l'algorithme central au temps $t-1$. Pour identifier, parmi ces candidats, lequel correspond à la particule, on applique l'algorithme central à chacun d'eux jusqu'à ce qu'on finisse par sortir des conditions sur k , r et w . On analyse ensuite le nombre de correspondances obtenues pour chaque candidat. On fait le postulat que celui pour lequel on obtient le plus grand nombre de correspondances et donc la plus longue trajectoire doit être la particule. Pour éliminer les situations où la particule ne serait aucun des candidats du temps t , on impose que le nombre minimal de

correspondances soit égal à 10. Si ce nombre n'est atteint pour aucun des candidats du temps t , on applique l'algorithme externe à tous les candidats du temps $t+1$.

3 Caractérisation des trajectoires obtenues

Cette section a pour but de présenter les caractéristiques intrinsèques des trajectoires obtenues. Deux trajectoires ont été mesurées pour le mobile TTP 125, à sa vitesse de rotation N_{js} (50 rpm) et à $2 N_{js}$. Une trajectoire a été mesurée avec le mobile EE 150 à sa vitesse de rotation N_{js} (20 rpm). Les durées totales d'acquisition sont respectivement de 42 h, 20 h et 12 h. Ces temps totaux résultent chacun de l'addition de plusieurs acquisitions de 1 à 2 h, car le temps d'une acquisition est limité par la taille maximale des fichiers txt pouvant être traités aisément dans Matlab®.

3.1 Structure des trajectoires

Il est assez difficile de représenter de manière claire un objet 3D comme une trajectoire sur un support 2D. En effet, aussi bien les représentations sous forme de graphique 3D que les tracés bidimensionnels dans les plans xy , xz , zy , ressemblent à des « magmas » de points dont les caractéristiques sont difficilement observables (Figure V-26).

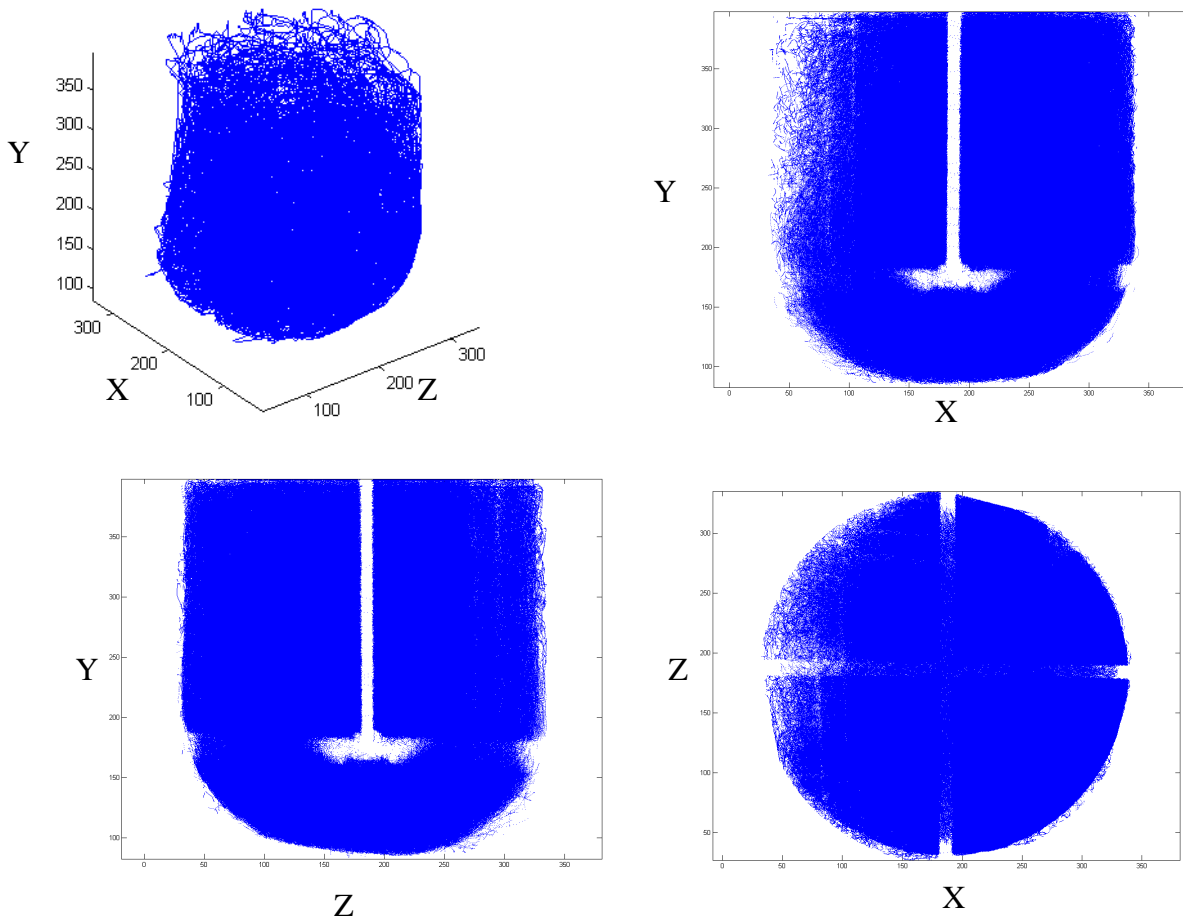


Figure V-26 : Représentation 3D et projection dans les plans xy , yz , xz de la trajectoire obtenue pendant 42 h lorsque le mobile TTP 125 mélange le contenu de la cuve avec une vitesse de rotation égale à N_{js} (soit 50 rpm)

Ces caractéristiques sont plus facilement mises en évidence si on coupe la longue trajectoire qui correspond à plusieurs heures d'acquisition, en fragments de quelques minutes et qu'on analyse la structure de ces différents fragments (Figure V-27). Dans ce but, des vidéos ont été élaborées dans l'environnement Matlab®. Ces vidéos montrent la construction progressive des fragments de la longue trajectoire.

Ces vidéos montrent qu'on retrouve globalement la structure de l'écoulement moyen mesurée par 3D P.I.V. (Chapitre III). En effet, dans les plans xy et zy , les fragments de trajectoires forment des boucles axiales autour du mobile et dans le plan xz , les fragments forment des structures qui tournent autour de l'axe de rotation du mobile dans le même sens que ce dernier. La nature « aléatoire » de l'écoulement turbulent est également visible : aucun fragment n'est identique à un fragment précédent. On constate par contre que ces morceaux de trajectoire sont relativement peu tortueux, ce qui semble indiquer que la particule suit préférentiellement les grandes structures de l'écoulement au détriment des plus petites.

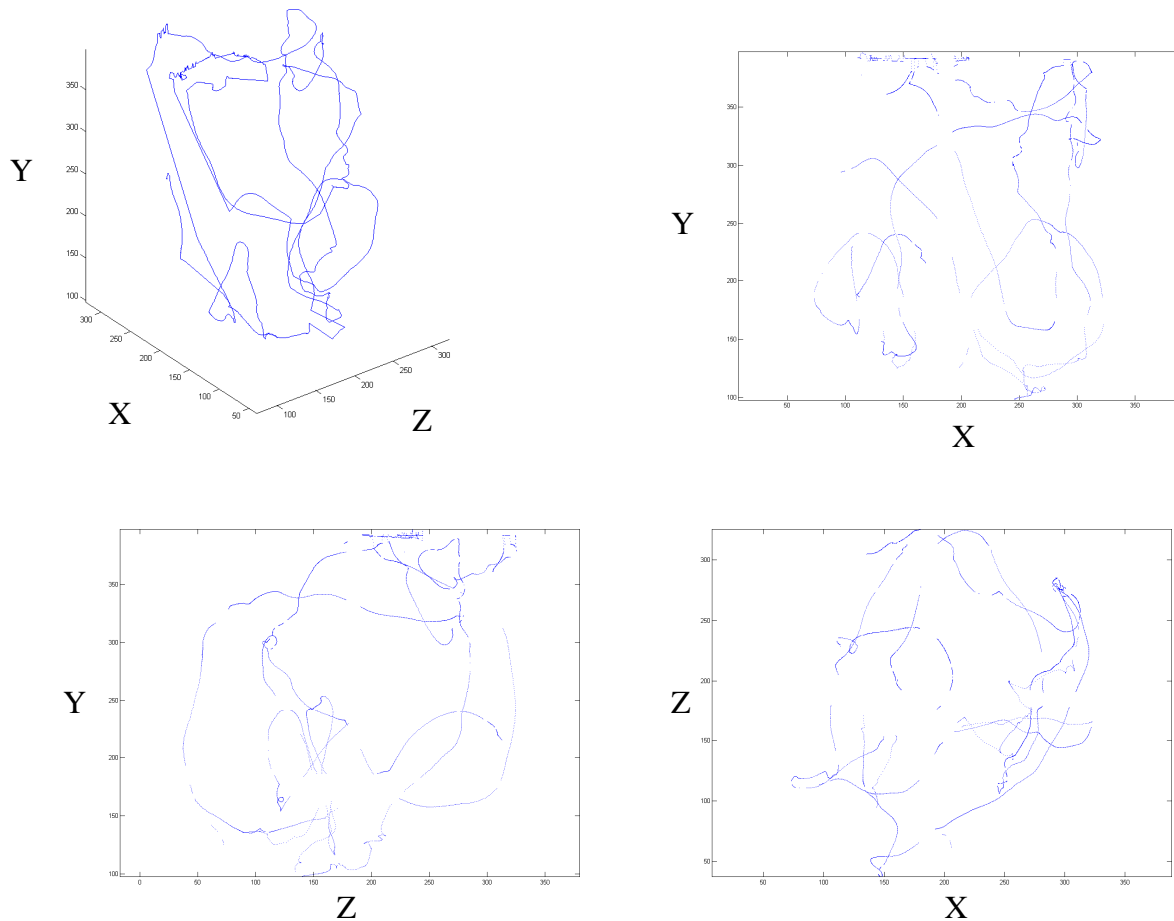


Figure V-27 : Représentation 3D et projection dans les plans xy , yz , xz d'un fragment de la trajectoire obtenue pendant 42 h lorsque le mobile TTP 125 mélange le contenu de la cuve avec une vitesse de rotation égale à N_{js} (soit 50 rpm). La durée correspondant à ce fragment est de 83 s.

La Figure V-26, la Figure V-27, ainsi que les vidéos montrent qu'avec la version actuelle du dispositif, il n'a pas été possible d'obtenir une trajectoire continue car la particule n'a pas pu être identifiée à tous les pas de temps. Les pas de temps manquants correspondent principalement à deux situations :

- La particule est devant ou derrière le mobile ou l'axe d'agitation par rapport à une des deux caméras. Elle ne peut donc pas être identifiée dans les images correspondant à cette caméra et sa position 3D ne peut pas être déterminée. Les zones géométriques de la cuve dans laquelle cette situation est rencontrée forment une espèce de croix (Figure V-26) dont le volume correspond à environ 14 % du volume de la cuve pour le mobile TTP 125 et 38 % pour le mobile EE 150. Ce pourcentage est nettement plus élevé pour le mobile EE 150 car il possède un volume et une surface projetée nettement supérieurs à ceux du mobile TTP 125.

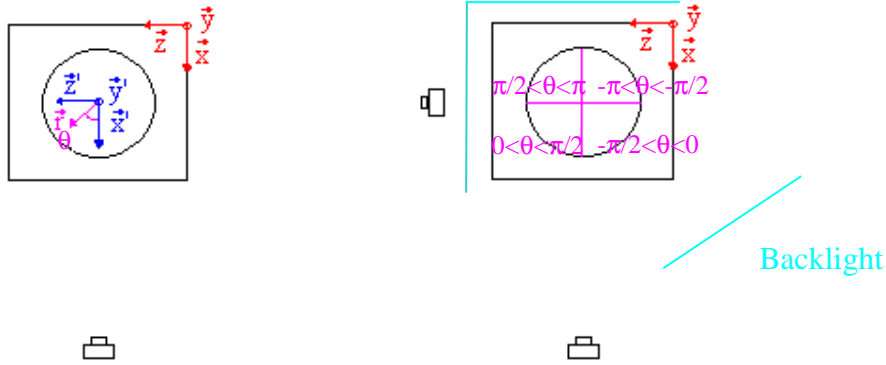


Figure V-28 : Passage d'un système de coordonnées cartésiennes à un système de coordonnées cylindriques dont l'origine est située sur l'axe de rotation du mobile. Découpe de la cuve en quatre quartiers caractérisés chacun par une gamme de valeurs de l'angle téta.

- Lorsque la particule se trouve dans certaines zones de la cuve, le logiciel d'analyse d'images en ligne n'est pas toujours capable de la détecter. Si on divise la cuve en quartiers comme indiqué dans la Figure V-28, on peut localiser ces zones problématiques dans le quart $\pi/2 < \theta < \pi$ et dans une partie du quart $-\pi < \theta < -\pi/2$. Bien que difficilement prévisibles *a priori*, les raisons de ce problème sont multiples.

Premièrement, le quart $\pi/2 < \theta < \pi$ est la zone de la cuve où la densité lumineuse est la plus intense, car elle est la plus proche des backlights. Il en résulte que, dans cette zone, la particule apparaît sur les images avec un niveau de gris plus clair que lorsqu'elle est ailleurs dans la cuve. Dans certaines images, ce niveau de gris devient inférieur au seuil de binarisation choisi lors de l'analyse en ligne. La particule est alors assimilée à du bruit et n'est donc pas détectée. Afin de remédier à ce problème, le seuil de binarisation a été modifié et l'homogénéité de l'éclairage de la cuve a été améliorée, grâce à une 3^{ème} backlight placée face au coin de l'aquarium opposé à celui des deux autres backlights (Figure V-28). Ces adaptations n'ont cependant pas permis d'éliminer complètement le problème. En effet, si le niveau du seuil de binarisation est modifié pour sélectionner des objets moins contrastés par rapport au liquide, certaines zones peu éclairées comme le fond de la cuve sont entièrement sélectionnées lors de la binarisation. Lorsque la particule se trouve dans cette zone, elle ne peut donc pas être identifiée. Nous avons donc préféré perdre la particule pour un nombre limité de pas de temps dans le quart $\pi/2 < \theta < \pi$, que de la perdre systématiquement dans la zone correspondant au fond de la cuve.

Une seconde raison du problème, qui permettrait d'expliquer la perte de la particule dans le quart $-\pi < \theta < -\pi/2$ à certains pas de temps, est un dysfonctionnement au niveau de l'acquisition et du traitement en ligne des images de la caméra 1. En effet, dans les

fichiers txt bruts des deux caméras, la somme de tous les pas de temps enregistrés correspond bien à la durée d'acquisition. Après élimination des points fixes, le *ratio* entre le nombre de pas enregistrés et la durée d'acquisition passe à 85 % dans les fichiers relatifs à la caméra 2 et à seulement 65 % pour les fichiers relatifs à la caméra 1. Cette différence de résultats est difficilement explicable car les paramètres d'acquisition des deux caméras ont été fixés à des valeurs similaires.

Faisons le bilan sur ce qui est mesuré et ce qui ne l'est pas. La fraction du temps d'acquisition où la particule est effectivement détectée est égale à environ 55 % pour le mobile TTP 125 et à 41 % pour le mobile EE 150. Les morceaux de trajectoire mesurés correspondent en moyenne à 83 (70) pas de temps successifs pour le mobile TTP 125 (EE 150) avec une durée maximale correspondant à 1101 (750) pas de temps. Les intervalles de temps où la particule n'est pas détectée entre ces morceaux de trajectoire comptent en moyenne 70 (100) pas de temps successifs pour le mobile TTP 125 (EE 150), avec une durée maximale de 1978 (1568) pas de temps.

Ce caractère discontinu des trajectoires est potentiellement problématique car il correspond à une perte d'une partie de l'information. A condition d'en tenir compte, il n'empêche toutefois pas une analyse quantitative des trajectoires mesurées.

3.2 Isoprobabilité de présence et symétrie

Les zones où on perd la particule sont essentiellement concentrées dans une moitié de la cuve. Si on peut faire l'hypothèse que l'état de macromélange de la cuve est le mélange parfait, alors les mesures réalisées dans une moitié de cuve seront représentatives de l'ensemble de la cuve.

Le but de la présente section est de vérifier cette hypothèse. Les mesures P.I.V. et P.L.I.F. n'ont mis en évidence aucune irrégularité majeure, du type zone morte, au sein de l'écoulement dans la cuve et l'écoulement dans la cuve est donc régulier. Pour être caractérisé de « macromélange parfait », l'écoulement au sein de la cuve doit en outre présenter les deux caractéristiques suivantes (Villermaux, 1993) :

- Chaque élément de fluide doit avoir visité l'ensemble du volume de la cuve au bout d'un temps infini ;
- Un élément de fluide a la même probabilité de présence dans toutes les zones de la cuve. On parle donc d'isoprobabilité de présence. Dès lors, la probabilité de trouver la particule dans une zone quelconque de la cuve est égale au rapport entre le volume de cette zone et le volume total de la cuve.

La première condition est difficile à vérifier car le temps d'acquisition total n'est pas infini. Il vaut respectivement 42 h, 20 h et 12 h dans les trois conditions étudiées dans ce travail. Cependant, lorsque l'on observe qualitativement les trajectoires mesurées, on observe qu'en termes d'espace, la particule visite assez rapidement toutes les zones de la cuve. Dès les premières mesures, l'enchevêtrement des trajectoires conduit à une structure tridimensionnelle qui s'étend dans toute la cuve. Le vide contenu dans la structure se réduit

au fur à mesure que le temps d'acquisition total augmente. La première condition semble donc vérifiée.

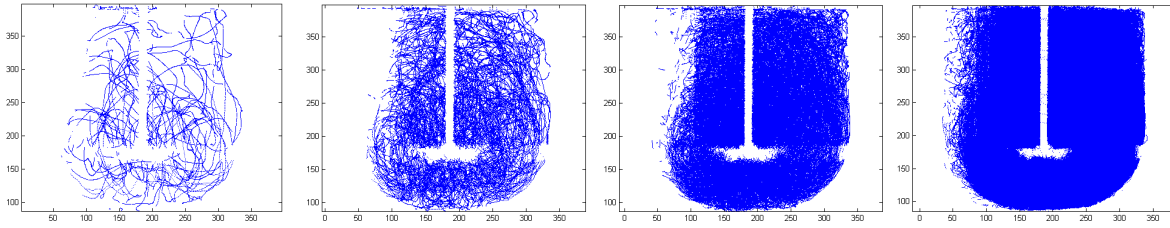


Figure V-29 : Evolution du volume de la cuve visité par la particule avec la durée d'acquisition. Les figures correspondent de gauche à droite à une durée de : 6 min, 30 min, 2 h et 10 h.

Les trajectoires mesurées n'étant pas continues, il n'est théoriquement pas possible de prouver l'isoprobabilité de présence dans l'ensemble du volume de la cuve à cause des données perdues. Cependant, certaines zones de la cuve semblent avoir été épargnées par cette perte de données. L'hypothèse d'isoprobabilité de présence sera donc testée dans ces zones. La zone choisie représente 5% du volume total de la cuve. Elle possède les coordonnées $-2\pi/6 < \theta < -\pi/6$, $0 < r < T/2$, $220 < y < 390$, dans le repère spatial cylindrique fixé sur l'axe de rotation du mobile (Figure V-30). Ce système d'axe a son origine située à la même hauteur que celle du repère spatial commun (Figure V-28). L'isoprobabilité sera vérifiée si la particule passe dans cette zone un temps de séjour total cumulé égale à 5 % du temps total d'acquisition. Pour calculer ce temps de séjour total cumulé, les pas de temps où la particule rentre dans la zone ainsi que ceux où elle en sort sont identifiés. La différence entre le pas de temps de sortie et le pas de temps d'entrée correspond au temps de séjour relatif à chaque visite. La somme de ces temps de séjour correspond au temps de séjour total cumulé. Pour les 3 conditions testées, les valeurs obtenues sont respectivement égales à 5.2 %; 4.8 % et 4.7 %. Ces valeurs très proches de 5%, prouvent l'isoprobabilité de présence dans ce volume.

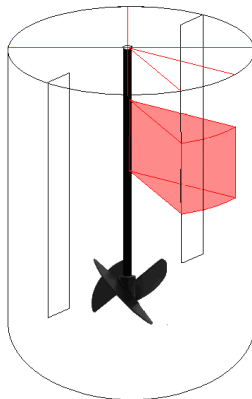


Figure V-30 : Zone géométrique de la cuve où est évalué l'isoprobabilité de présence de la particule.

L'isoprobabilité dans les directions « radiale » et « axiale » a également été vérifiée en comparant les temps de séjour cumulés dans des zones de même volume situées à différentes distances de l'axe et à différentes hauteurs dans la cuve. Les résultats présentés sur la Figure V-31 ont été obtenus en divisant la zone illustrée sur la Figure V-30 en 5 volumes égaux, soit

sur sa hauteur (Figure V-31, gauche), soit sur son rayon (Figure V-31, droite). Des temps de séjour totaux cumulés de l'ordre de 1 % sont bien observés.

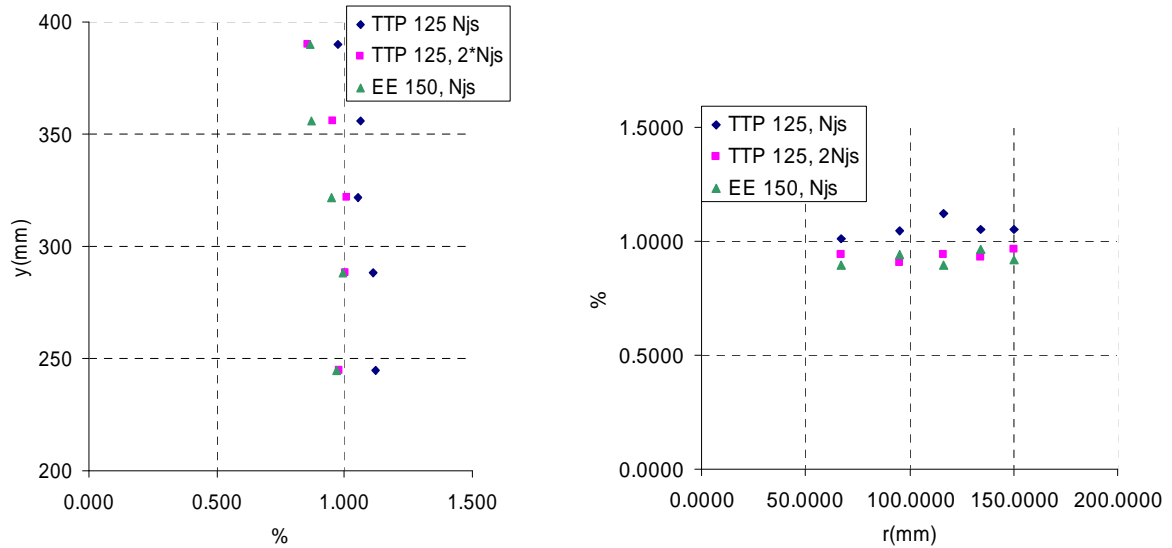


Figure V-31 : Evolution de l'isoprobabilité de présence selon la hauteur de la cuve (gauche) et son rayon (droit) pour les trois conditions d'acquisition.

En faisant l'hypothèse d'isoprobabilité de présence dans l'ensemble du volume de la cuve, il est possible d'évaluer la quantité d'informations perdue dans chaque zone de la cuve, suite à la non détection de la particule. Le nombre de pas de temps où la particule est identifiée dans chaque quart de la cuve (Figure V-28) peut être rapporté au temps total d'acquisition et comparé au résultat théorique, égal à 25 %. Les résultats de ce calcul sont présentés dans le Tableau V-3. Les valeurs les plus proches de 25 % sont obtenues dans les quarts de cuve $0 < \theta < \pi/2$ et $-\pi/2 < \theta < 0$. Si on tient compte du fait que le volume cumulé des zones où la particule est pour au moins une des deux caméras devant ou derrière le mobile ou son axe, est égal à 14 % (3.5 % par quart de cuve) du volume de la cuve pour le mobile TTP 125 et à 38 % (9.5 % par quart de cuve) pour le mobile EE 150, on constate qu'aucune information supplémentaire n'est perdue dans ces deux quarts de cuve. Dans les deux autres quarts de cuve, par contre, la quantité d'informations perdue est nettement plus grande.

L'information mesurée par trajectographie dans les deux quarts de cuve $0 < \theta < \pi/2$ et $-\pi/2 < \theta < 0$ est donc fiable. Vu la symétrie de la cuve, on peut supposer que l'information collectée dans cette moitié de cuve est représentative de ce qui aurait été mesuré dans l'autre moitié de cuve. La suite des résultats présentés dans cette thèse est basée sur cette hypothèse, l'ensemble des calculs étant réalisé sur base des mesures obtenues dans les deux quarts de cuve correspondant à $0 < \theta < \pi/2$ et $-\pi/2 < \theta < 0$.

Tableau V-3 : Pourcentage du temps total où la particule est identifiée dans chaque quart de cuve.

	% du temps total où la particule est dans le quart de cuve :			
	$0 < \theta < \pi/2$	$\pi/2 < \theta < \pi$	$-\pi/2 < \theta < 0$	$-\pi < \theta < -\pi/2$
TTP 125, Njs	17.7	8.1	22.1	12.3
TTP 125, 2 Njs	16.3	4.6	20.6	8.6

L'isoprobabilité de présence de la particule dans toutes les zones de la cuve pourrait laisser penser que les mesures de trajectographie ne sont pas vraiment utiles. En effet, connaissant la fraction du volume de la cuve occupée par la zone problématique, il est possible de calculer le temps cumulé total que chaque microporteurs et donc chaque cellule passe dans cette zone en multipliant le temps total de culture par la fraction de volume problématique. Ce temps cumulé n'est cependant pas suffisant pour quantifier complètement l'impact du cisaillement sur le développement cellulaire. En effet, deux autres grandeurs sont particulièrement importantes pour quantifier cet effet. Ce sont la fréquence à laquelle la cellule est soumise à des conditions défavorables et le temps qu'elle passe dans ces conditions à chaque exposition. Or ces deux grandeurs varient d'une zone à l'autre de la cuve. Au sein de chaque zone, elles ne sont pas caractérisées par une valeur unique et la distribution de ces valeurs ne peut être établie qu'à partir des mesures lagrangiennes.

En fait, le temps de séjour dans une zone, la fréquence de visite et le temps de séjour total cumulé dans cette zone sont trois grandeurs liées entre-elles et liées à une quatrième qui est le débit net instantané de fluide dans cette zone. Pitiot (1999) propose l'exemple simplifié suivant pour illustrer le lien entre ces quatre grandeurs. Imaginons un dispositif contenant deux zones de volumes égaux V , parcourues chacune par des débits volumiques très différents q et q' (Figure V-32). La fréquence à laquelle un élément de fluide visite l'une ou l'autre est fonction du débit volumique dans chaque zone. Cette fréquence de visite, qui peut être également perçue comme la probabilité que la particule entre dans l'une ou l'autre zone, peut se calculer par :

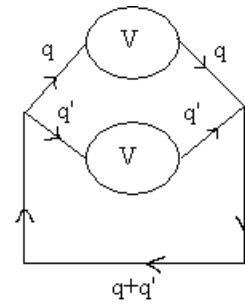


Figure V-32 : Modèle simplifié à deux zones présenté par Pitiot (1999).

$$f_{visite}(zone1) = \frac{q}{q+q'} \quad f_{visite}(zone2) = \frac{q'}{q+q'} \quad (V-34)$$

Le temps de séjour à chaque visite est fonction du débit volumique et du volume de la zone. Il s'estime par :

$$t_s(zone1) = \frac{V}{q} \quad t_s(zone2) = \frac{V}{q'} \quad (V-35)$$

Le temps de séjour total cumulé est égal au produit de la fréquence de visite par le temps de séjour à chaque visite. Ainsi :

$$T_{s,cumulé}(zone1) = f_{visite} t_s = \frac{V}{q+q'} = T_{s,cumulé}(zone2) \quad (V-36)$$

Il y a donc compensation entre fréquence de visite et temps de séjour à chaque visite dans le cas d'un écoulement au sein d'une cuve parfaitement mélangée ; ce qui explique la condition d'isoprobabilité de présence. Ainsi, un élément de fluide passera fréquemment dans une zone à haut débit mais y restera un temps de séjour plus court à chaque visite. Il passera moins fréquemment dans une zone à faible débit mais y restera un temps de séjour plus long à chaque visite. Notons encore, que contrairement à l'exemple donné ci-dessus, le débit net instantané fluctue avec le temps dans toutes les zones d'une cuve au sein de laquelle règne un écoulement turbulent. C'est pourquoi le temps de séjour et la fréquence de visite dans

chacune des zones ne sont pas caractérisés par une valeur unique mais plutôt par une distribution de valeurs.

3.3 Validation et convergence

Pour valider les trajectoires obtenues, comparons les à des mesures qui sont disponibles, à savoir les champs de vitesse moyens et turbulents mesurés par 3D P.I.V.. Pour prouver que les temps d'acquisition sont suffisamment longs, montrons que les résultats mesurés ont convergés vers des valeurs constantes.

Le calcul des champs de vitesse moyens, du champ de l'énergie cinétique turbulent et des champs des moyennes quadratiques des fluctuations de vitesse a été réalisé en appliquant la méthodologie suivante :

- La vitesse instantanée de la particule est calculée à partir de ses positions successives dans la moitié de la cuve correspondant à $-\pi/2 < \theta < \pi/2$ (Figure V-28). Ce calcul est réalisé dans le repère spatial cylindrique associé à l'axe de rotation du mobile ;
- Tout comme lors de l'analyse des mesures P.I.V., un demi-plan axial de la cuve est maillé en utilisant des éléments carrés de 2 mm de côté ;
- Les vitesses instantanées obtenues dans une demi-cuve sont ensuite projetées dans ce demi-plan axial en identifiant le carré du maillage auquel est associé chaque valeur mesurée de la vitesse instantanée de la particule ;
- A partir de ces vitesses instantanées, une vitesse moyenne peut être calculée dans chaque carré du maillage ;
- Cette vitesse moyenne est ensuite soustraite des valeurs instantanées, afin d'obtenir les valeurs des fluctuations de vitesse dans chaque carré du maillage. La moyenne quadratique de ces grandeurs peut ensuite être estimée ainsi que l'énergie cinétique turbulente.

Les résultats obtenus pour les trois conditions étudiées dans ce travail sont présentés dans les Figures V-33 à V-35. De manière générale, les structures d'écoulement déduites des résultats de trajectographie sont similaires à celles issues des mesures 3D P.I.V.. Cette similarité est confirmée lorsque l'on compare les profils axiaux des différents champs obtenus par 3D-P.I.V. avec ceux obtenus par trajectographie. Les Figures V-36 à V-41 montrent qu'un très bon accord est observé entre les profils axiaux de la norme de la vitesse moyenne et de l'énergie cinétique turbulente. Un accord similaire peut être observé au niveau des composantes axiales, radiales et tangentielles des champs moyens et des moyennes quadratiques des composantes correspondantes des champs fluctuants. Ce résultat permet donc de valider les trajectoires mesurées par trajectographie optique.

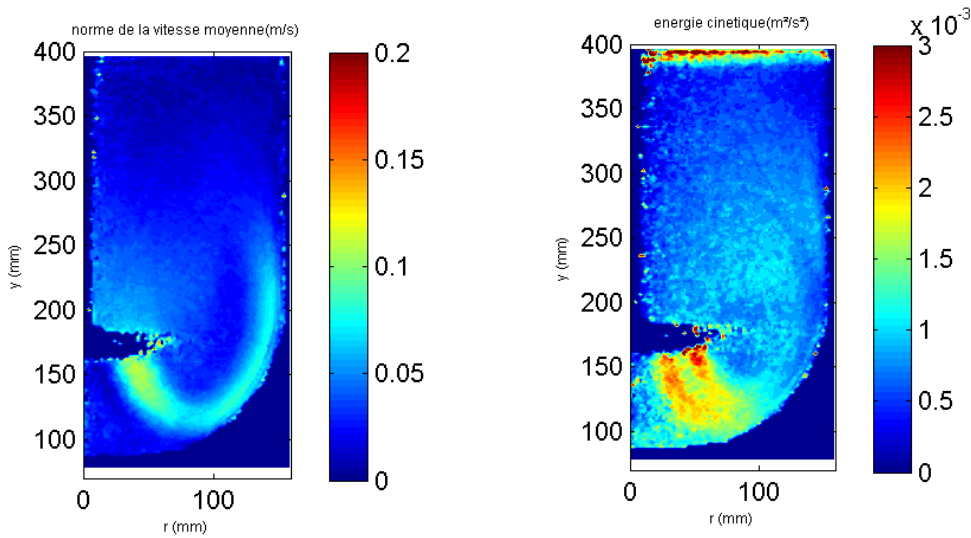


Figure V-33 : Champ moyen de vitesse et champ d'énergie cinétique turbulente obtenus à partir de 42 h d'acquisition d'une trajectoire mesurée lorsque le mobile TTP 125 tourne à la vitesse de rotation N_{js} .

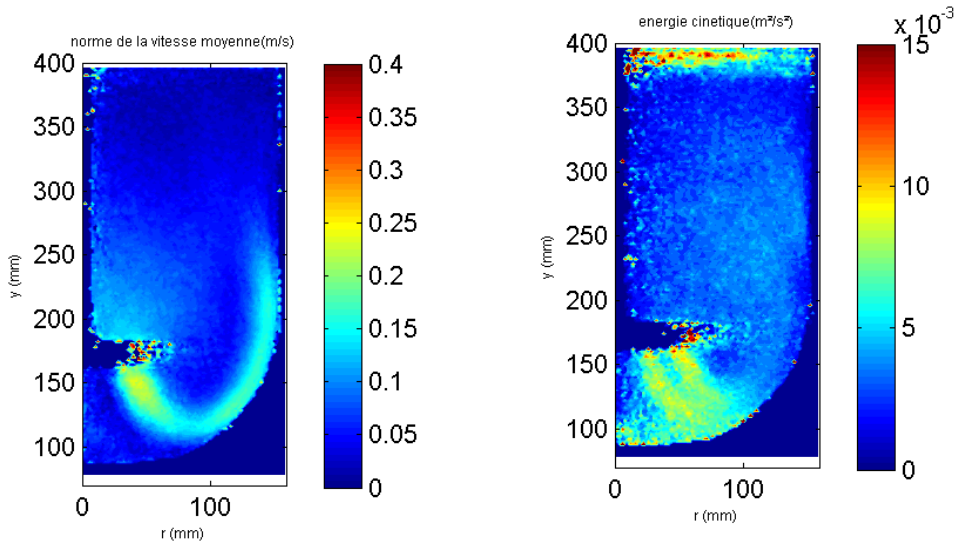


Figure V-34 : Champ moyen de vitesse et champ d'énergie cinétique turbulente obtenus à partir de 20 h d'acquisition d'une trajectoire mesurée lorsque le mobile TTP 125 tourne à la vitesse de rotation $2 N_{js}$.

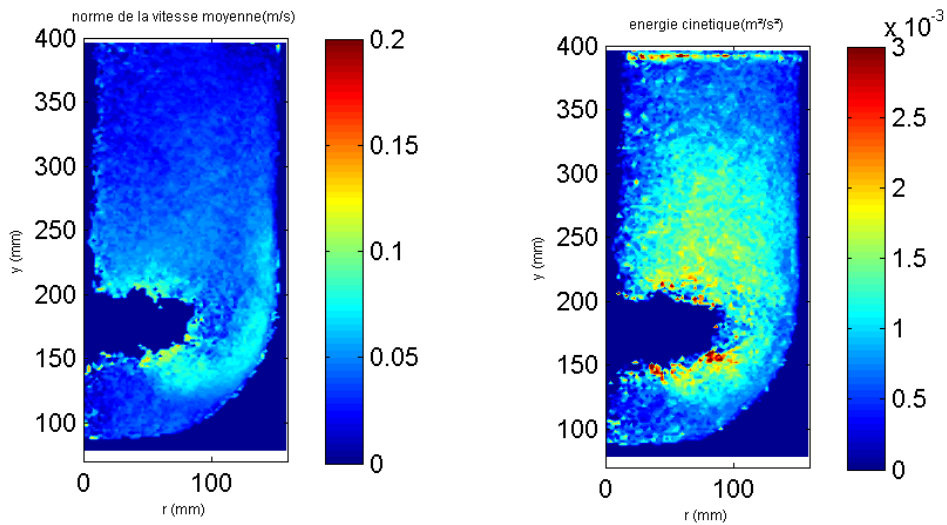


Figure V-35 : Champ moyen de vitesse et champ d'énergie cinétique turbulente obtenus à partir de 12 h d'acquisition d'une trajectoire mesurée lorsque le mobile EE 150 tourne à la vitesse de rotation N_{js} .

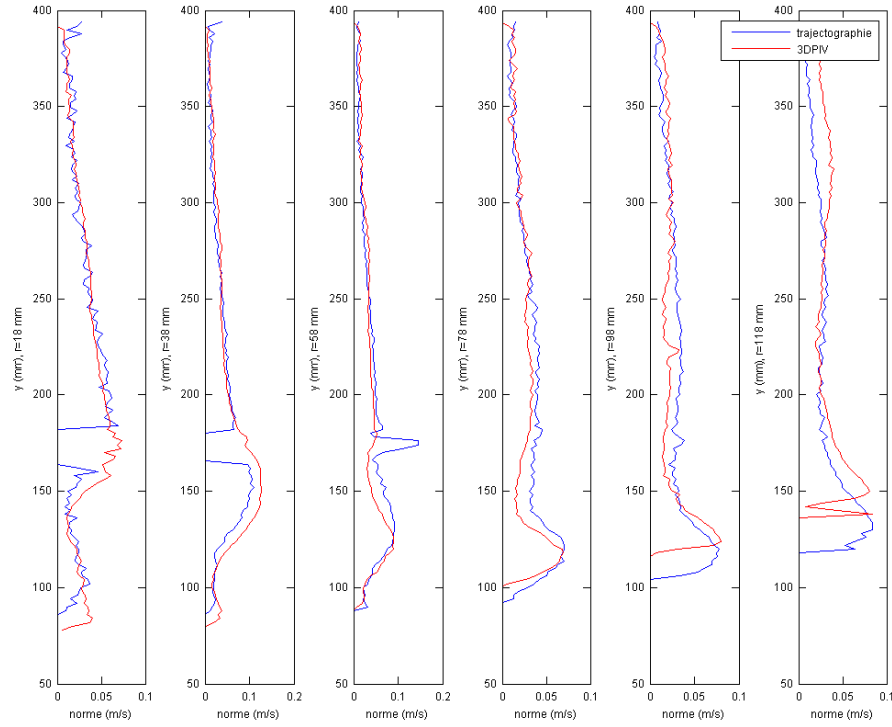


Figure V-36 : Comparaison des profils axiaux du champ moyen de vitesse estimé par trajectographie (bleu) et mesuré par 3D P.I.V. (rouge). Ces résultats sont relatifs à la trajectoire de 42 h acquise lorsque le mobile TTP 125 tourne à la vitesse de rotation N_{js} .

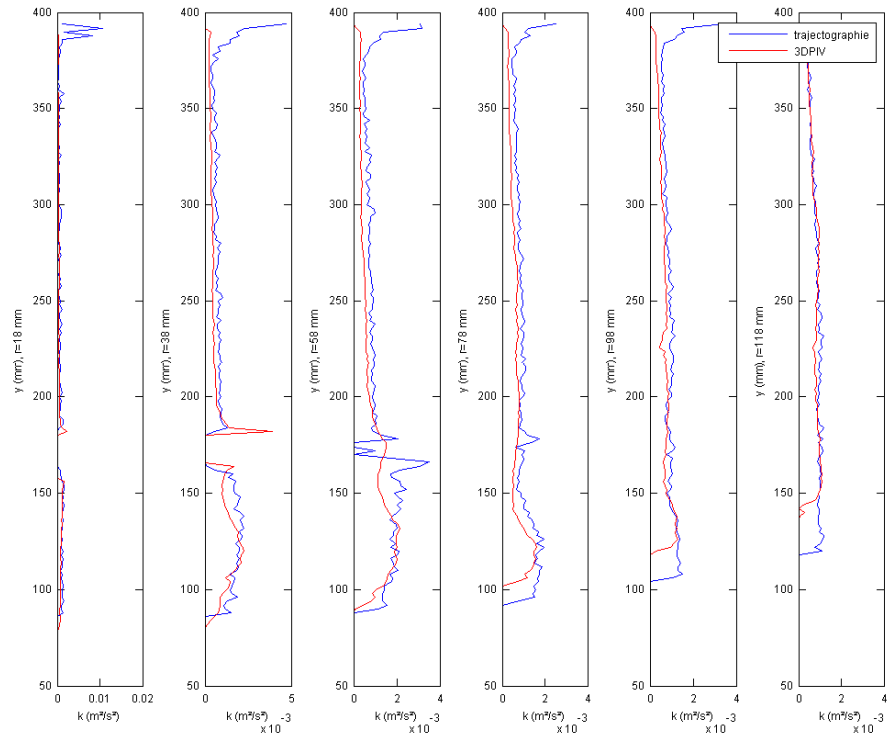


Figure V-37 : Comparaison des profils axiaux du champ d'énergie cinétique turbulente estimé par trajectographie (bleu) et mesuré par 3D P.I.V. (rouge). Ces résultats sont relatifs à la trajectoire de 42 h acquise lorsque le mobile TTP 125 tourne à la vitesse de rotation N_{js} .

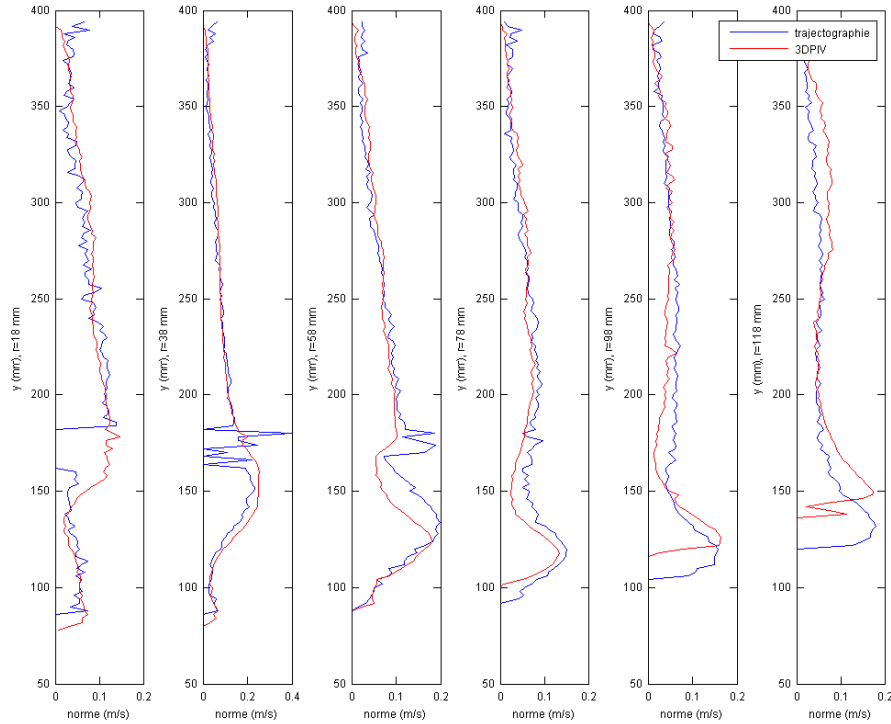


Figure V-38 : Comparaison des profils axiaux du champ moyen de vitesse estimé par trajectographie (bleu) et mesuré par 3D P.I.V. (rouge). Ces résultats sont relatifs à la trajectoire de 20 h acquise lorsque le mobile TTP 125 tourne à la vitesse de rotation $2 N_{js}$.

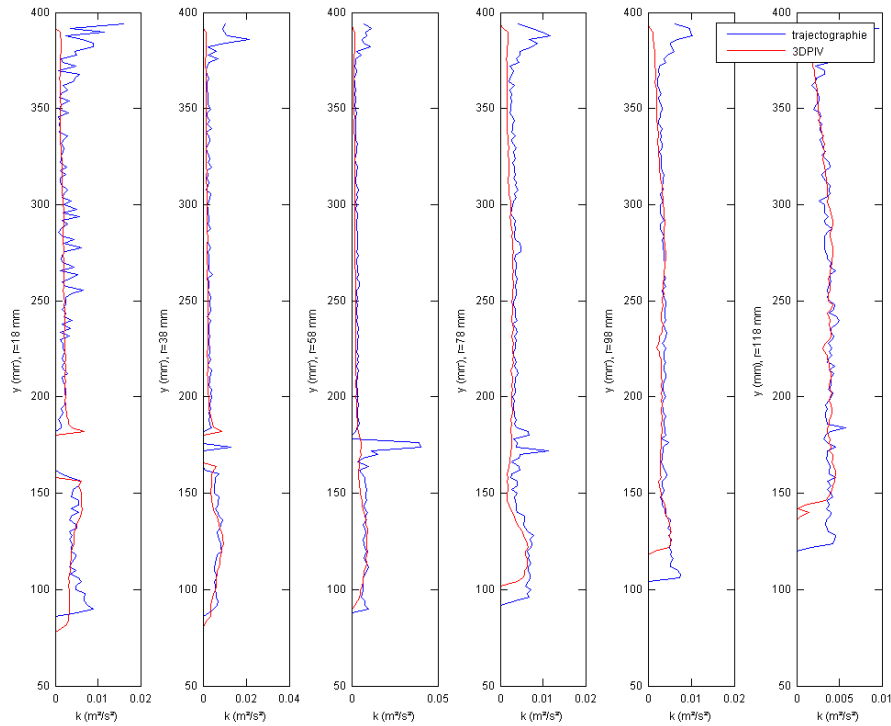


Figure V-39 : Comparaison des profils axiaux du champ d'énergie cinétique turbulente estimé par trajectographie (bleu) et mesuré par 3D P.I.V. (rouge). Ces résultats sont relatifs à la trajectoire de 20 h acquise lorsque le mobile TTP 125 tourne à la vitesse de rotation $2 N_{js}$.

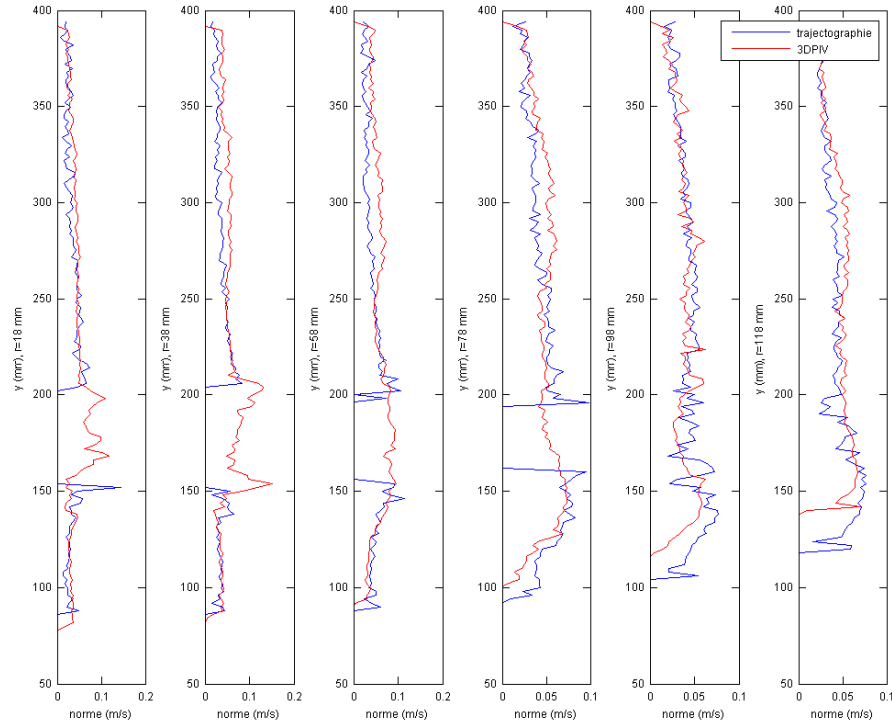


Figure V-40 : Comparaison des profils axiaux du champ moyen de vitesse estimé par trajectographie (bleu) et mesuré par 3D P.I.V. (rouge). Ces résultats sont relatifs à la trajectoire de 12 h acquise lorsque le mobile EE 150 tourne à la vitesse de rotation N_{js} .

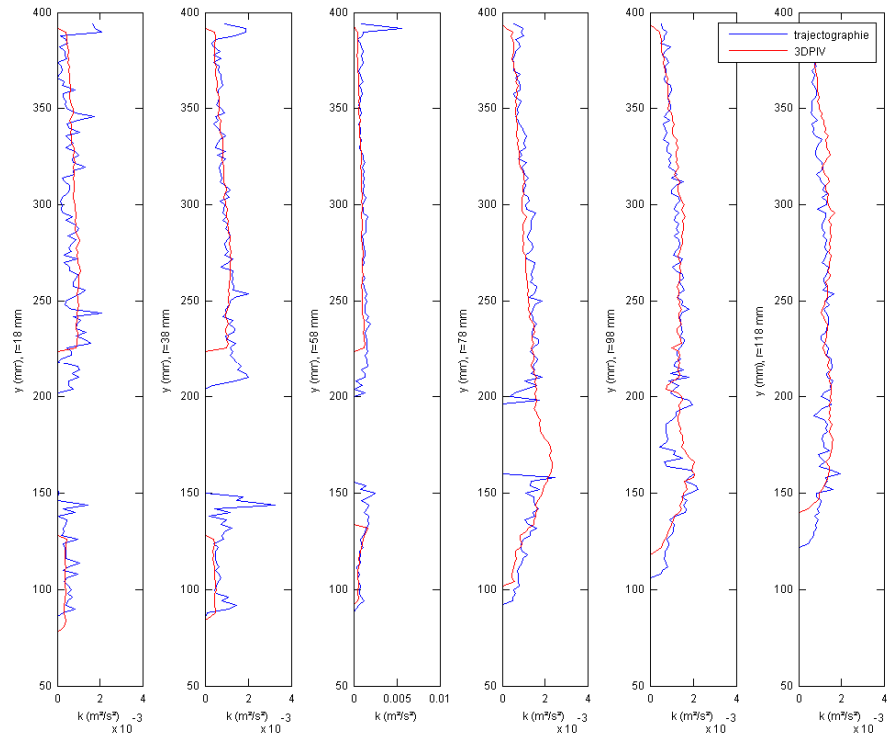


Figure V-41 : Comparaison des profils axiaux du champ d'énergie cinétique turbulente estimé par trajectographie (bleu) et mesuré par 3D P.I.V. (rouge). Ces résultats sont relatifs à la trajectoire de 12 h acquise lorsque le mobile EE 150 tourne à la vitesse de rotation N_{js} .

Sur les Figures V-36 à V-41, les profils obtenus à partir des trajectoires sont plus bruités que ceux obtenus par 3D P.I.V.. Ce résultat semble logique au vu des principes de base de chaque technique. En effet, d'un côté, la particule utilisée en trajectographie est grosse (491 μm) alors que celles utilisées en 3D P.I.V. sont très petites ($\sim 20 \mu\text{m}$). Il y a une seule particule en trajectographie par pas de temps contre au moins dix particules dans chaque carré du maillage en 3D P.I.V.. La statistique relative à chaque point du profil est donc nettement meilleure pour les mesures 3D P.I.V. que pour les grandeurs déduites des mesures de trajectographie. La statistique relative aux grandeurs mesurées par trajectographie pourrait être améliorée en augmentant le nombre de données enregistrées et donc le temps total d'acquisition. Plus ce dernier sera élevé et plus les résultats qui correspondent à des moyennes convergeront vers des valeurs constantes.

Il est par ailleurs possible de vérifier si les temps totaux d'acquisition utilisés sont suffisamment longs que pour obtenir des résultats convergés. Pour réaliser cette étude, sept carrés du maillage, répartis dans l'ensemble du demi-plan axial (Figure V-42) et correspondant à des situations bien différentes par rapport à la structure de l'écoulement (jet à la sortie des pales, centre de boucle de recirculation....) ont été sélectionnés. Pour chaque carré du maillage, l'évolution des grandeurs hydrodynamiques $(\overline{u_x}, \overline{u_y}, \overline{u_z}, \sqrt{\overline{u_x^2 + u_y^2 + u_z^2}}, \sqrt{\overline{u_x'^2}}, \sqrt{\overline{u_y'^2}}, \sqrt{\overline{u_z'^2}}, k = 0.5(\overline{u_x'^2} + \overline{u_y'^2} + \overline{u_z'^2}))$ avec le temps d'acquisition est analysée. Les

résultats sont présentés dans les Figures V-43 à V-45. L'encadré supérieur droit dans chacune de ces figures (nombre d'événements) montre également l'évolution du nombre de données traitées dans le carré du maillage en fonction du temps d'acquisition. Deux informations intéressantes peuvent être tirées de ces graphiques. Premièrement, la convergence d'une

grandeur hydrodynamique donnée n'est pas atteinte au même moment dans toutes les zones de la cuve (dans tous les carrés sélectionnés). C'est dû au fait que le nombre de données collectées après un même temps d'acquisition dépend du carré considéré. Dans les carrés où beaucoup de données sont rapidement collectées, les grandeurs hydrodynamiques calculées convergeront plus rapidement. Il s'agit des carrés correspondant aux couleurs jaune, bleu ciel, noir et vert, qui sont situés dans la boucle de recirculation supérieure du fluide et dans le jet à la sortie des pales. Notons que le fait qu'on n'obtienne pas le même nombre de données dans chaque carré après un temps donné d'acquisition ne va pas à l'encontre de la condition d'isoprobabilité de présence. En effet, dans l'espace 3D, les volumes qui correspondent aux carrés du maillage ne sont pas de tailles égales; ceux proche de l'axe du mobile sont plus petits que ceux proches de la paroi de la cuve.

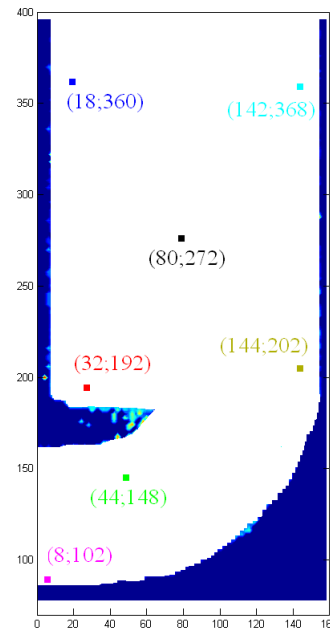


Figure V-42 : Positions des 7 carrés sélectionnés pour étudier la convergence des résultats. Les couleurs font référence aux couleurs employées dans les figures ci-dessous.

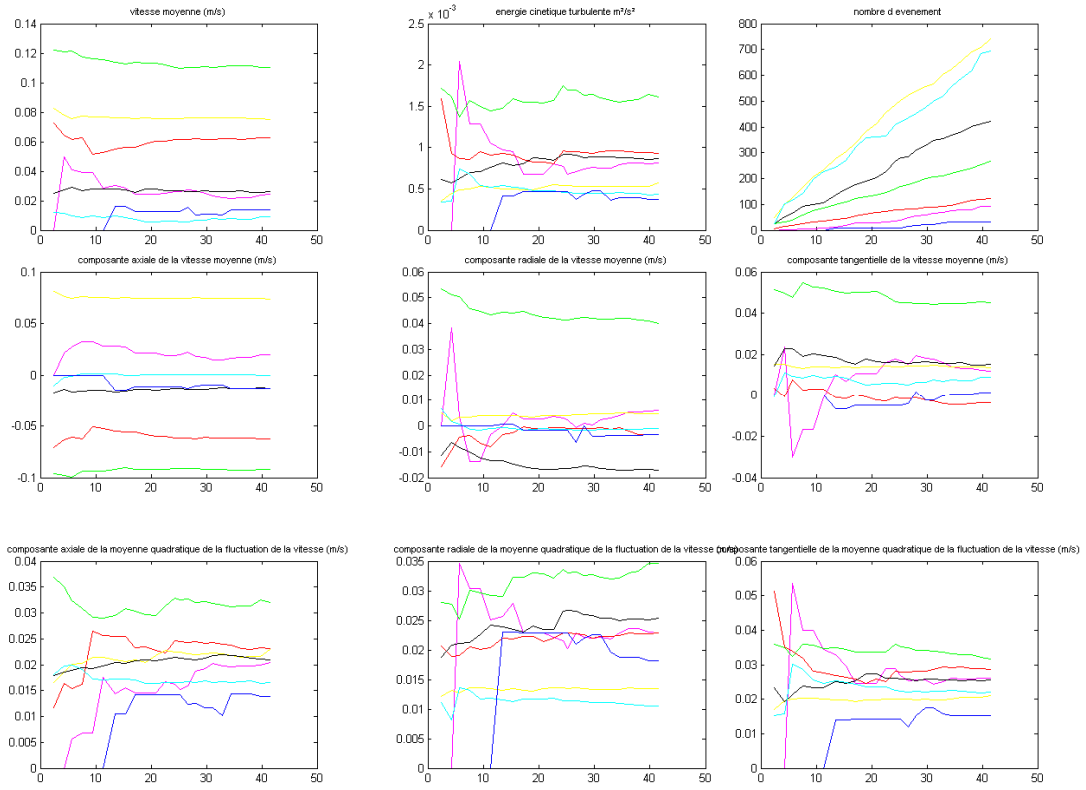


Figure V-43 : Evolution avec le temps d'acquisition des valeurs des grandeurs hydrodynamiques dans 7 carrés du maillage. Les grandeurs sont calculées à partir de la trajectoire de 42 h acquise lorsque le mobile TTP 125 tourne à la vitesse de rotation N_{js} .

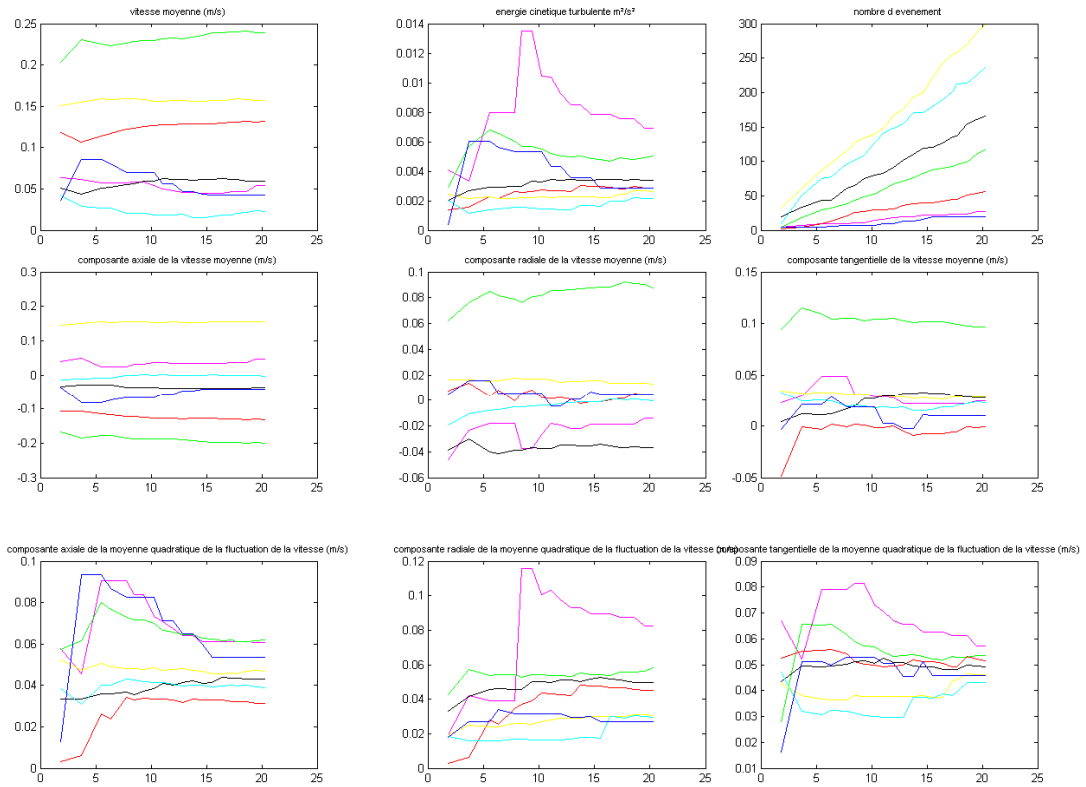


Figure V-44 : Evolution avec le temps d'acquisition des valeurs des grandeurs hydrodynamiques dans 7 carrés du maillage. Les grandeurs sont calculées à partir de la trajectoire de 20 h acquise lorsque le mobile TTP 125 tourne à la vitesse de rotation $2 N_{js}$.

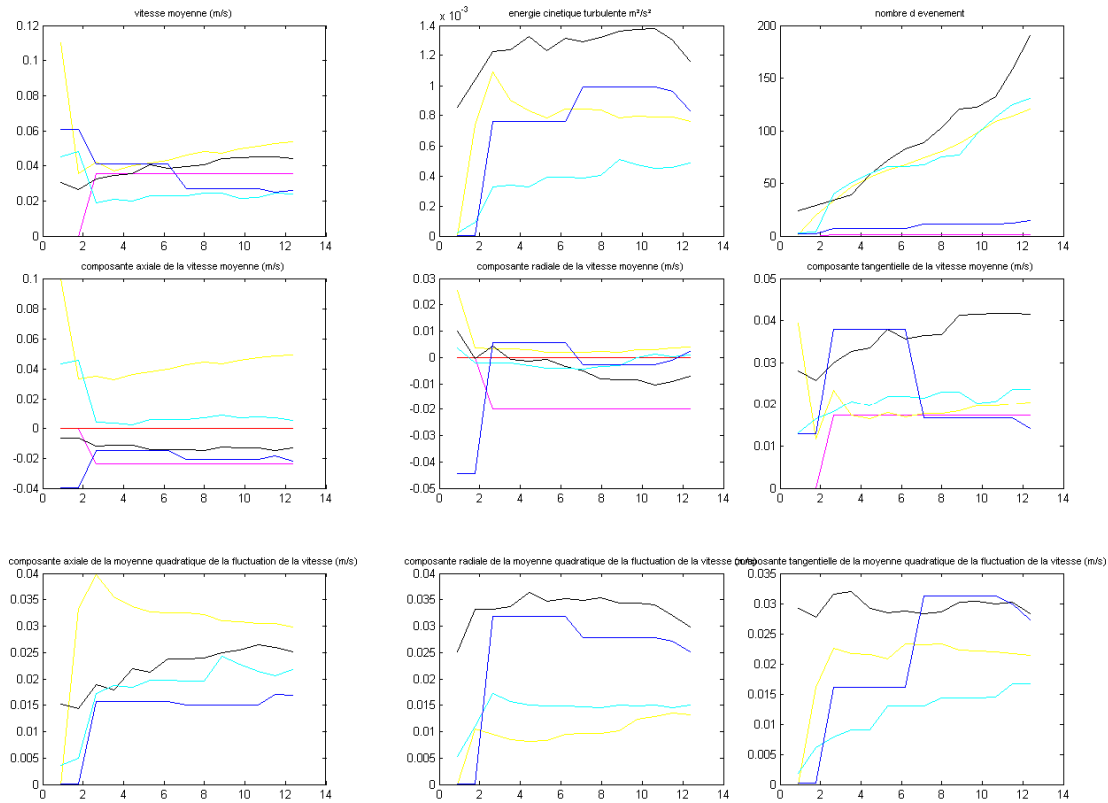


Figure V-45 : Evolution avec le temps d'acquisition des valeurs des grandeurs hydrodynamiques dans 7 carrés du maillage. Les grandeurs sont calculées à partir de la trajectoire de 12 h acquise lorsque le mobile EE 150 tourne à la vitesse de rotation N_{js}

La deuxième information est le temps total d'acquisition nécessaire. La Figure V-43 semble montrer qu'un temps total d'acquisition de 42 h soit suffisant pour obtenir des grandeurs hydrodynamiques convergées dans une grande partie de l'écoulement lorsque la cuve est mélangée par le mobile TTP 125 à la vitesse de rotation N_{js} . Suite à ce premier résultat, il avait été initialement décidé d'acquérir des trajectoires pendant 42 h pour les deux autres conditions. Les temps totaux d'acquisition correspondant à ces deux conditions ont été raccourcis (20 h et 12 h) à cause de problèmes expérimentaux imprévus. Pour les acquisitions faites avec le mobile TTP 125 à la vitesse de rotation $2 N_{js}$, il est apparu après analyse que la particule s'était coincée dans l'interstice entre la paroi et une des contre-pales pendant approximativement 22 h d'acquisition. Ces 22 h d'acquisition ont donc dû être éliminées des résultats. Le temps total d'acquisition, lorsque la cuve est agitée avec le mobile EE 150, a quant à lui été limité à 12 h d'acquisition car la caméra 1 est tombée en panne. Remplacer cette caméra par la 3^{ème} caméra non utilisée aurait nécessité de recommencer toute la phase de réglage, ce qui représente 2 à 3 semaines de travail, ce qui n'était plus envisageable dans le cadre de ce travail de thèse. Bien que les temps d'acquisition relatifs à ces deux conditions soient nettement plus courts, les profils présentés sur les Figures V-41 et V-42 montrent que les résultats obtenus sont proches de la convergence.

4 Conclusion

Dans ce chapitre, nous avons décrit l'appareil de trajectographie que nous avons conçu et mis au point. En particulier, nous avons mis en évidence les solutions qui ont été apportées aux différents problèmes rencontrés. Les étapes clés de ce processus ont été :

- Le choix des appareils qui constituent le dispositif ;
- La fabrication de la particule de traceur et la démonstration de ses capacités à suivre l'écoulement ;
- La modélisation de l'ensemble du dispositif afin de pouvoir repositionner la particule lorsque ses positions dans les deux images acquises par les caméras sont connues ;
- Une gestion raisonnée de la grande quantité d'informations présente dans chaque image acquise par chaque caméra, grâce au développement d'un logiciel qui conserve sélectivement l'information souhaitée ;
- Le développement d'un code Matlab[®] permettant d'identifier à chaque pas de temps la particule parmi les informations enregistrées afin de construire sa trajectoire pas à pas.

Les trajectoires acquises dans trois conditions différentes ont ensuite été caractérisées. Il a été observé qu'elles rendent bien compte de la structure de l'écoulement moyen et turbulent présent au sein de la cuve. La validité et la convergence des résultats obtenus par trajectographie ont pu également être démontrées en comparant les champs de vitesse calculés à partir des trajectoires avec ceux mesurés par 3D P.I.V.. Ces résultats permettent donc de dire que le dispositif de trajectographie élaboré est opérationnel et fonctionnel.

Le défaut du dispositif dans sa version actuelle est qu'il ne permet pas d'obtenir des trajectoires continues, car la particule n'est pas détectée pour certains pas de temps. Pour régler ce problème, des adaptations du dispositif sont nécessaires. Le logiciel de traitement en ligne devrait par exemple être modifié pour permettre de tenir compte de l'intensité lumineuse locale dans le choix du seuil de binarisation. L'utilisation de plus de deux caméras permettrait de réduire les zones où la particule est cachée derrière un objet ou simplement non détectée par une caméra. Ces adaptations nécessitent un temps de développement qui n'était plus compatible avec l'agenda de cette thèse. Elles seront donc menées après celle-ci.

Cependant, les discontinuités dans les trajectoires mesurées n'empêchent pas une analyse quantitative de ces dernières car l'information acquise dans une moitié de cuve est quasi-complète. Ainsi, il sera possible de coupler les informations eulériennes issues des mesures 3D P.I.V. aux informations lagrangiennes issues des mesures de trajectographie afin de tenter de caractériser le lien existant entre les conditions d'agitation du bioréacteur d'un part et l'environnement physico-chimique perçu par les cellules animales fixées sur les microporteurs d'autre part. C'est à quoi est consacré le chapitre suivant.

Liste des symboles

EE 150	Mobile axial de modèle « Elephant Ear » (Applikon) diamètre $d=150$ mm	
TTP 125	Mobile axial de modèle TTP (Mixel) et de diamètre $d=125$ mm	
$F_{1,2}$	Point focal des caméras 1 et 2 qui est également l'origine du repère spatial qui leur est associé.	
\vec{n}	Vecteur directeur indiquant l'orientation de la normale	
P	Point P de coordonnées (X,Y,Z) dans le repère spatial commun	
P_{aq}	Point appartenant à une des deux faces externes de l'aquarium faisant face aux caméras et de coordonnées $(X_{aq\ 1,2}, Y_{aq\ 1,2}, Z_{aq\ 1,2})$ dans le repère spatial commun.	
$P_{cam1,cam2}$	Même point appartenant à une des deux faces externes de l'aquarium faisant face aux caméras mais dont les coordonnées $(X_{cam\ 1,2}, Y_{cam\ 1,2}, Z_{cam\ 1,2})$ sont exprimées dans le repère associé à la caméra.	
$P_{capteur}$	Projection du point P_{aq} sur le capteur de la caméra dans le cas d'une lentille parfaite. Ses coordonnées sont $(X_{capteur}, Y_{capteur}, f)$ dans le repère de la caméra.	
P_d	Projection déformée du point P_{aq} sur le capteur de la caméra dans le cas où sa lentille introduit des déformations.	
P_{plan}	Point appartenant au plan de la mire lors de la stéréo-calibration. Ses coordonnées sont $(X_{plan}, Y_{plan}, Z_{plan})$ dans le repère spatial associé à la mire.	
Q_y, Q_z	Matrice de rotation autour des axes \vec{x} et \vec{y} du repère spatial commun.	
R	Matrice de rotation permettant de passer d'un repère spatial à l'autre	
R_{cam1_cam2}	Matrice de rotation permettant d'aligner les axes du repère associé à la caméra 1 à ceux associés à la caméra 2.	
R_{plan}	Matrice de rotation permettant d'aligner les axes du repère associé à la mire collée sur la face de l'aquarium à ceux du repère de la caméra 2	
\vec{v}_1, \vec{v}_2	Vecteurs directeurs donnant l'orientation des faisceaux lumineux	
$\vec{v}_{incident,refracté}$	Vecteur directeur du rayon incident (réfracté) dans les lois de Snell Descartes.	
$\vec{x}, \vec{y}, \vec{z}$	Vecteurs directeurs donnant l'orientation des axes des repères spatiaux	
C_x	Coefficient de trainée de la particule de traceur	[-]
(cc_x, cc_y)	Position du point principal dans le repère de l'image	[pixel]
d_p	Diamètre de la particule de traceur	[m]
f	Distance focale des caméras	[m]
f_x, f_y	Correspond au $ratio\ f/m_x$ et f/m_y	[pixel]
f_{visite}	Fréquence de visite d'une zone	[-]
g	Accélération de la pesanteur	[m s ⁻²]
k	Energie cinétique turbulente	[m ² s ⁻²]
k_1, k_2, k_3, k_4	Coefficient du modèle décrivant les distorsions introduites par la lentille	[-]
l, l'	paramètres des équations paramétriques des droites	[-]
m_x, m_y	Facteur de conversion entre les unités métriques et les unités pixel.	
	locale à l'interface entre deux matériaux	[-]
na, n_b	Indice de réfraction des substances constituant l'interface.	[-]
N	Vitesse de rotation du mobile	[rpm]

N_{js}	Vitesse de rotation minimale de maintien en suspension complète des microporteurs	[rpm]
Re_p	Nombre de Reynolds de la particule	[-]
(r, θ, y)	Coordonnées cylindriques du repère spatial placé sur l'axe de symétrie de la cuve.	[m, °, m]
St	Nombre de Stokes de la particule	[-]
T	Vecteur de translation permettant de passer d'un repère spatial à l'autre	[m]
$T_{origine}$	Vecteur de translation exprimant la position de l'origine du repère associé à la mire collée sur la face de l'aquarium dans le repère spatial commun.	[m]
T_{cam1_cam2}	Vecteur de translation exprimant la position du repère associé à la caméra 1 dans le repère associé à la caméra 2.	[m]
T_{plan}	Vecteur de translation exprimant la position de l'origine du repère associé à la mire collée sur la face de l'aquarium dans le repère de la caméra 2	[m]
$T_{s, \text{cumulé}}$	Temps de séjour total cumulé dans une zone de la cuve	[s]
t	Temps	[s]
t_s	Temps de séjour dans une zone de la cuve lors d'une visite	[s]
\bar{u}	Vitesse moyenne temporelle	[m s ⁻¹]
$\sqrt{\overline{u'^2}}$	Moyenne quadratique de la fluctuation de la vitesse u'	[m s ⁻¹]
v_{lim}	Vitesse limite de chute de la particule dans un fluide stagnant	[m s ⁻¹]
(x_d, y_d)	Coordonnées adimensionnelles du point P_d	[-]
(x_n, y_n)	Coordonnées adimensionnelles du point $P_{capteur}$	[-]
(x_{pixels}, y_{pixels})	Coordonnées d'un objet dans le repère de l'image	[pixels]
X, Y, Z	Coordonnées d'un point P dans le repère spatial commun	[m]
$(X_{aq\ 1,2}, Y_{aq\ 1,2}, Z_{aq\ 1,2})$	Coordonnées du point P_{aq} dans le repère spatial commun	[m]
$(X_{cam}, Y_{cam}, Z_{cam})$	Coordonnée du point P_{aq} dans le repère de la caméra	[m]
$(X_{capteur}, Y_{capteur}, f)$	Coordonnées du point $P_{capteur}$ dans le repère de la caméra	[m]
ε	Taux de dissipation de l'énergie cinétique turbulente	[m ² s ⁻³]
$\theta_{incident, \text{réfracté}}$	Angle formé entre le rayon incident (réfracté) et la normale locale à l'interface dans les lois de Snell-Descartes.	[°]
$\lambda_{Kolmogorov}$	Echelle de Kolmogorov	[m]
λ_{Taylor}	Echelle de Taylor	[m]
ν	Viscosité cinématique	[m ² s ⁻¹]
ρ	Masse volumique	[kg m ⁻³]
τ_f	Temps de réponse du fluide	[s]
τ_p	Temps de réponse de la particule	[s]

Table des Figures

<i>Figure V-1 : Schéma de principe du dispositif de trajectographie optique.....</i>	<i>217</i>
<i>Figure V-2 : Bille d'alginate.....</i>	<i>219</i>
<i>Figure V-3 : Générateur de gouttes à courant d'air coaxial mis à disposition par le Centre Interfacultaire des Biomatériaux (gauche) : photo montrant la solution de CaCl_2 et le générateur au centre duquel se trouve l'aiguille de la seringue contenant la solution de Na-Alginate (droite) : schéma de principe du générateur montrant comment l'air est injecté dans le cylindre creux et favorise le détachement des gouttes.</i>	<i>219</i>
<i>Figure V-4 :</i>	<i>221</i>
<i>Figure V-5 : Panneau backlight (Phlox S.A.).</i>	<i>223</i>
<i>Figure V-6 : Caméra Falcon 4M60 avec son optique Linos Inspecx.L et son dispositif linéaire.</i>	<i>224</i>
<i>Figure V-7 : Illustration des traitements réalisés à l'aide du logiciel pour identifier la position dans l'image de candidats pouvant être potentiellement la particule.</i>	<i>225</i>
<i>Figure V-8 : Tableau de contrôle du logiciel développé en partenariat avec Y. Daoust.</i>	<i>226</i>
<i>Figure V-9 : Position du repère dans l'image.</i>	<i>227</i>
<i>Figure V-10 : Position du repère spatial commun.</i>	<i>227</i>
<i>Figure V-11 : Détermination de la position du point P dans le référentiel spatial commun par le calcul de l'intersection des deux droites passant respectivement par le point focal F_1 et l'image du point P sur le capteur 1 et le point focal F_2 et l'image du point P sur le capteur 2.</i>	<i>227</i>
<i>Figure V-12 : Déformation introduite par la lentille.....</i>	<i>228</i>
<i>Figure V-13 : Réfraction des faisceaux lumineux à travers les différents matériaux.....</i>	<i>228</i>
<i>Figure V-14 : Illustration des liens géométriques qui existent entre la position d'un point P de coordonnées $(X_{cam}, Y_{cam}, Z_{cam})$, son image sur le capteur de la caméra de coordonnées $(X_{capteur}, Y_{capteur}, f)$ et ses coordonnées dans l'image (x_{pixel}, y_{pixel}).</i>	<i>229</i>
<i>Figure V-15 : (gauche) image non déformée, (milieu) image ayant subi de la déformation radiale, (droite) image ayant subi de la déformation radiale et tangentielle.....</i>	<i>230</i>
<i>Figure V-16 : Images de la mire en damier placée de différentes manières.</i>	<i>231</i>

<i>Figure V-17 : Déformations introduites par l'optique des caméras. Elles sont exprimées en pixels et représentées en valeur par les lignes de niveaux et en orientation par les flèches bleues.</i>	232
<i>Figure V-18 : Position relative de deux repères spatiaux.</i>	234
<i>Figure V-19 : Référentiel associé à la mire.</i>	235
<i>Figure V-20 : Position relative du repère spatial associé à la mire et du repère spatial commun.</i>	235
<i>Figure V-21 : Position des différents éléments dans le repère spatial commun.</i>	236
<i>Figure V-22 : Opérations nécessaires pour établir la relation mathématique qui relie $(x_{pixel}, y_{pixel})_{cam1 \text{ ou } cam2}$ aux coordonnées du point P_{aq} situé sur la paroi externe de l'aquarium dans le repère spatial commun.</i>	237
<i>Figure V-23 : Réfraction à travers les différents matériaux qui composent la cuve et l'aquarium.</i>	239
<i>Figure V-24 : Coupe horizontale de la cuve obtenue à une hauteur $y = -159.6 \text{ mm}$ et $y = -446.6 \text{ mm}$.</i>	239
<i>Figure V-25 : Comparaison du modèle géométrique de la cuve par rapport aux points expérimentaux obtenues par tomographie à rayons X.</i>	240
<i>Figure V-26 : Représentation 3D et projection dans les plans xy, yz, xz de la trajectoire obtenue pendant 42 h lorsque le mobile TTP 125 mélange le contenu de la cuve avec une vitesse de rotation égale à N_{js} (soit 50 rpm).</i>	246
<i>Figure V-27 : Représentation 3D et projection dans les plans xy, yz, xz d'un fragment de la trajectoire obtenue pendant 42 h lorsque le mobile TTP 125 mélange le contenu de la cuve avec une vitesse de rotation égale à N_{js} (soit 50 rpm). La durée correspondant à ce fragment est de 83 s.</i>	247
<i>Figure V-28 : Passage d'un système de coordonnées cartésiennes à un système de coordonnées cylindriques dont l'origine est située sur l'axe de rotation du mobile. Découpe de la cuve en quatre quartiers caractérisés chacun par une gamme de valeurs de l'angle θ.</i>	248
<i>Figure V-29 : Evolution du volume de la cuve visité par la particule avec la durée d'acquisition. Les figures correspondent de gauche à droite à une durée de : 6 min, 30 min, 2 h et 10 h.</i>	250
<i>Figure V-30 : Zone géométrique de la cuve où est évalué l'isoprobabilité de présence de la particule.</i>	250

Figure V-31 : Evolution de l'isoprobabilité de présence selon la hauteur de la cuve (gauche) et son rayon (droit) pour les trois conditions d'acquisition.	251
Figure V-32 : Modèle simplifié à deux zones présenté par Pitiot (1999).	252
Figure V-33 : Champ moyen de vitesse et champ d'énergie cinétique turbulente obtenus à partir de 42 h d'acquisition d'une trajectoire mesurée lorsque le mobile TTP 125 tourne à la vitesse de rotation N_{js}	254
Figure V-34 : Champ moyen de vitesse et champ d'énergie cinétique turbulente obtenus à partir de 20 h d'acquisition d'une trajectoire mesurée lorsque le mobile TTP 125 tourne à la vitesse de rotation $2 N_{js}$	254
Figure V-35 : Champ moyen de vitesse et champ d'énergie cinétique turbulente obtenus à partir de 12 h d'acquisition d'une trajectoire mesurée lorsque le mobile EE 150 tourne à la vitesse de rotation N_{js}	254
Figure V-36 : Comparaison des profils axiaux du champ moyen de vitesse estimé par trajectographie (bleu) et mesuré par 3D P.I.V. (rouge). Ces résultats sont relatifs à la trajectoire de 42 h acquise lorsque le mobile TTP 125 tourne à la vitesse de rotation N_{js}	255
Figure V-37 : Comparaison des profils axiaux du champ d'énergie cinétique turbulente estimé par trajectographie (bleu) et mesuré par 3D P.I.V. (rouge). Ces résultats sont relatifs à la trajectoire de 42 h acquise lorsque le mobile TTP 125 tourne à la vitesse de rotation N_{js}	255
Figure V-38 : Comparaison des profils axiaux du champ moyen de vitesse estimé par trajectographie (bleu) et mesuré par 3D P.I.V. (rouge). Ces résultats sont relatifs à la trajectoire de 20 h acquise lorsque le mobile TTP 125 tourne à la vitesse de rotation $2 N_{js}$	256
Figure V-39 : Comparaison des profils axiaux du champ d'énergie cinétique turbulente estimé par trajectographie (bleu) et mesuré par 3D P.I.V. (rouge). Ces résultats sont relatifs à la trajectoire de 20 h acquise lorsque le mobile TTP 125 tourne à la vitesse de rotation $2 N_{js}$	256
Figure V-40 : Comparaison des profils axiaux du champ moyen de vitesse estimé par trajectographie (bleu) et mesuré par 3D P.I.V. (rouge). Ces résultats sont relatifs à la trajectoire de 12 h acquise lorsque le mobile EE 150 tourne à la vitesse de rotation N_{js}	257
Figure V-41 : Comparaison des profils axiaux du champ d'énergie cinétique turbulente estimé par trajectographie (bleu) et mesuré par 3D P.I.V. (rouge). Ces résultats sont relatifs à la trajectoire de 12 h acquise lorsque le mobile EE 150 tourne à la vitesse de rotation N_{js}	257
Figure V-42 : Positions des 7 carrés sélectionnés pour étudier la convergence des résultats. Les couleurs font référence aux couleurs employées dans les figures ci-dessous.	258

Figure V-43 : Evolution avec le temps d'acquisition des valeurs des grandeurs hydrodynamiques dans 7 carrés du maillage. Les grandeurs sont calculées à partir de la trajectoire de 42 h acquise lorsque le mobile TTP 125 tourne à la vitesse de rotation N_{js} . .259

Figure V-44 : Evolution avec le temps d'acquisition des valeurs des grandeurs hydrodynamiques dans 7 carrés du maillage. Les grandeurs sont calculées à partir de la trajectoire de 20 h acquise lorsque le mobile TTP 125 tourne à la vitesse de rotation $2 N_{js}$ 259

Figure V-45 : Evolution avec le temps d'acquisition des valeurs des grandeurs hydrodynamiques dans 7 carrés du maillage. Les grandeurs sont calculées à partir de la trajectoire de 12 h acquise lorsque le mobile EE 150 tourne à la vitesse de rotation N_{js}260

Table des Tableaux

<i>Tableau V-1 : Présentation des caractéristiques de la particule utilisée comme traceur dans ce travail.</i>	<i>222</i>
<i>Tableau V-2 : Paramètres intrinsèques des deux caméras obtenus par calibration.</i>	<i>232</i>
<i>Tableau V-3 : Pourcentage du temps total où la particule est identifiée dans chaque quart de cuve.</i>	<i>251</i>

Bibliographie

Bouguet, J.Y., site web: <http://www.vision.caltech.edu/bouguetj/> où sont disponibles les codes Matlab® pour réaliser la calibration des caméras. Consulté pour la dernière fois le 27 avril 2012.

Brown, D., 1966. Decentering distortions of lenses. *Photography Engineering* 32, 444-462.

Kaye et Laby, *Tables of Physical & Chemical Constants*. Base de données en ligne : www.kayelaby.npl.co.uk. Consulté pour la dernière fois le 27 avril 2012.

Pitiot, P., 1999. Caractérisation par trajectographie tridimensionnelle du mélange dans un réacteur agité. Thèse de doctorat. Institut National Polytechnique de Lorraine. Nancy, France.

Toye, D., Crine, M., Marchot, P., 2005. Imaging of liquid distribution in reactive distillation packings with a new high energy x-ray tomograph. *Measurement Science and Technology* 16, 2213-2220.

Villermaux, J., 1993. Génie de la réaction chimique. 2nd Edition. Lavoisier. Paris, France.

Wittmer, S., 1996. Caractérisation du mélange dans une cuve agitée par trajectographie. Thèse de doctorat. Institut National Polytechnique de Lorraine. Nancy, France.

Chapitre VI :

Caractérisation par une approche combinée Euler-Lagrange de l'écoulement turbulent généré par les mobiles TTP 125 et EE 150 au sein du bioréacteur à cuve agitée utilisé en culture de cellules animales sur microporteurs

Résumé.....	272
1 Introduction.....	273
2 Distribution de temps de séjour de la particule dans la zone labélisée comme problématique pour le développement cellulaire.....	274
2.1 Méthodologie.....	274
2.1.1 Découpe de la cuve.....	274
2.1.2 Découpe de la trajectoire.....	276
2.2 Résultats.....	278
2.2.1 Effet du critère.....	278
2.2.2 Effet de la vitesse de rotation du mobile.....	284
2.2.3 Effet du type de mobile.....	285
3 Superposition des trajectoires et des champs de la moyenne des contraintes normales.....	287
3.1 Méthodologie.....	287
3.2 Résultats.....	288
4 Conclusion.....	290
Liste des symboles.....	293
Table des figures.....	294
Table des tableaux.....	296
Bibliographie.....	297

Résumé

Dans ce chapitre, les informations eulériennes déterminées au Chapitre III sont combinées aux informations lagrangiennes mesurées au Chapitre V pour, enfin, établir un lien entre la succession d'environnements hydrodynamiques perçus par des cellules fixées sur des microporteurs et les conditions d'agitation du bioréacteur.

Elles sont analysées à l'aide de deux outils :

Le premier outil utilise une division du volume de la cuve en deux zones sur base des données eulériennes : la première zone est labélisée comme potentiellement problématique pour le développement cellulaire, l'autre est labélisée comme non problématique. Cette découpe est basée sur la distribution spatiale du *ratio* entre l'échelle de Kolmogorov λ_K et la taille moyenne des microporteurs d_p . Trois valeurs seuils de ce *ratio* ont été sélectionnées pour diviser la cuve : 1, $\frac{2}{3}$ et $\frac{1}{2}$. Les données lagrangiennes servent quant à elles à établir les distributions de temps de séjour de la particule dans chacune des deux zones ainsi que la distribution de temps mis par la particule pour réaliser un cycle complet « visite de la zone problématique – visite de la zone non problématique ». L'analyse des distributions ainsi obtenues montrent que :

- Plus le critère λ_K / d_p est strict ($\lambda_K / d_p = 1$ étant le plus strict), plus la zone problématique est étendue et plus la particule aura de chance de passer un temps long à chaque visite dans cette zone. Puisque la zone non problématique est de plus en plus cantonnée dans la partie supérieure de la cuve, la particule met également un temps plus long pour réaliser un cycle. Elle passe aussi proportionnellement un temps plus long dans la zone problématique que dans la zone non problématique à chaque cycle vu l'évolution du rapport des volumes des zones correspondantes.
- Lorsque la vitesse de rotation du mobile augmente, la taille de la zone problématique s'étend rapidement, cantonnant la zone non problématique dans la partie supérieure de la cuve. La conséquence est que, même si la particule se déplace plus vite dans la cuve, elle met des temps globalement plus longs pour réaliser un cycle et elle passe également un temps plus long dans la zone problématique à chaque visite.
- La comparaison des distributions de temps obtenues pour chaque mobile à la vitesse de rotation N_{js} semble indiquer que le mobile TTP 125 est mieux adapté pour la culture de cellules animales sur microporteurs que le mobile EE 150 car, d'une part, la particule fait globalement des cycles plus longs, *i.e.*, elle revient dans la zone problématique à une fréquence moindre et, d'autre part, elle reste en moyenne un temps plus long dans la zone non problématique que dans la zone problématique à chaque fois qu'elle les visite.

Le deuxième outil consiste à superposer les trajectoires (données lagrangiennes) aux champs eulériens de la moyenne des contraintes normales. Cet outil permet surtout de se rendre compte des très nombreuses fluctuations de l'environnement hydrodynamique auquel est soumise la particule au cours du temps.

1 Introduction

Dans ce chapitre, les informations eulériennes déterminées au Chapitre III sont combinées aux informations lagrangiennes mesurées au Chapitre V pour, enfin, établir un lien entre la succession d'environnements hydrodynamiques perçus par des cellules fixées sur des microporteurs et les conditions d'agitation du bioréacteur.

Cependant pour arriver à ce résultat, deux hypothèses sont nécessaires :

- La première est de considérer que la particule utilisée lors des mesures trajectographiques se déplace dans la cuve comme un microporteur. Les deux particules diffèrent légèrement en densité (masses volumiques respectives de 1028 kg m^{-3} et de 1030 kg m^{-3}) et en taille (diamètres respectifs de $491 \text{ }\mu\text{m}$ et de $250 \text{ }\mu\text{m}$) mais lorsqu'on calcule leurs temps caractéristiques τ_p respectifs et qu'on les compare aux temps caractéristiques des structures locales de l'écoulement τ_f (selon la méthodologie présentée au Point 2.2.1 du Chapitre V), on constate que les deux types de particule ont toutes les deux un nombre de Stokes St largement inférieur à 1. Il varie entre 0.02 et 0.09 pour la particule de microporteur en fonction de la vitesse de rotation du mobile et en fonction de l'échelle caractéristique de l'écoulement considérée (échelle de Taylor ou échelle de Kolmogorov). Le nombre de Stokes de la particule de traceur varie, pour rappel, entre 0.02 et 0.07. Cette observation permet donc de dire que les deux particules peuvent être assimilées à un élément de fluide puisqu'elles suivent parfaitement les structures locales de l'écoulement turbulent. On peut également en conclure qu'elles se déplacent de la même manière dans la cuve.
- La seconde hypothèse est de supposer que déplacement d'un microporteur dans la cuve est indépendant de celui des autres microporteurs. Formellement, cette hypothèse n'est pas tout à fait correcte car il est fort probable que les microporteurs entrent en collisions, ce qui modifie plus ou moins leur trajectoire. Mais, d'une part, il n'est pas possible avec le dispositif de trajectographie optique de mesurer directement la trajectoire suivie par une particule dans une suspension liquide-solide car le milieu doit rester optiquement transparent. D'autre part, nous n'avons aucun moyen de quantifier la déviation des trajectoires dues aux collisions. Nous allons donc admettre l'hypothèse même si nous avons conscience de ses limites.

L'étude Euler-Lagrange présentée dans ce chapitre est basée sur deux types d'analyse :

- Premièrement, les distributions de temps de séjour de la particule dans les zones labélisées comme problématiques pour le développement cellulaire sont établies. Ces zones ont été identifiées, au Chapitre III, sur base de la distribution spatiale des valeurs du rapport entre l'échelle de Kolmogorov λ_K et la taille moyenne des microporteurs d_p . Trois valeurs seuils pour ce *ratio* (λ_K / d_p) avaient été sélectionnées : 1, $\frac{2}{3}$ et $\frac{1}{2}$. Les distributions de temps de séjour sont donc analysées sur base de ces trois valeurs seuils. L'influence de la

vitesse de rotation du mobile (N_{js} et $2 N_{js}$ pour le mobile TTP 125) et du type de mobile (TTP 125 et EE 150) sont également analysés.

- Deuxièmement, les trajectoires suivies par la particule sont superposées aux champs de la moyenne des contraintes normales τ_N établis au Chapitre III. Cette superposition permet de déterminer la distribution des contraintes normales rencontrées par la particule le long de sa trajectoire.

2 Distribution de temps de séjour de la particule dans la zone labélisée comme problématique pour le développement cellulaire

2.1 Méthodologie

Le calcul des distributions de temps de séjour de la particule dans les zones problématiques DTS_{zone} a été réalisé dans l'environnement Matlab[®]. La méthodologie mise au point, exposée ci-dessous, consiste tout d'abord à découper la cuve en deux zones suivant que la valeur locale du *ratio* λ_K/d_p est inférieure ou supérieure à la valeur seuil choisie et, ensuite à retrouver, dans les trajectoires mesurées, les pas de temps correspondant au passage de la particule dans chacune des deux zones.

2.1.1 Découpe de la cuve

La cuve est découpée en deux zones, l'une labélisée comme potentiellement problématique pour le développement cellulaire, l'autre comme non-problématique. Comme décidé au Chapitre III, cette découpe de la cuve est basée sur les cartes représentant la répartition spatiale du *ratio* entre la valeur locale de l'échelle de Kolmogorov λ_K et le diamètre moyen des microporteurs d_p . Ces cartes ont été établies à partir des mesures 3D P.I.V.. La zone problématique est la zone où la valeur locale du *ratio* λ_K/d_p est inférieure à un certain seuil. Trois valeurs seuils ont été sélectionnées d'après les valeurs les plus fréquemment citées dans la littérature. Il s'agit des valeurs λ_K/d_p égales à 1, $2/3$ et $1/2$.

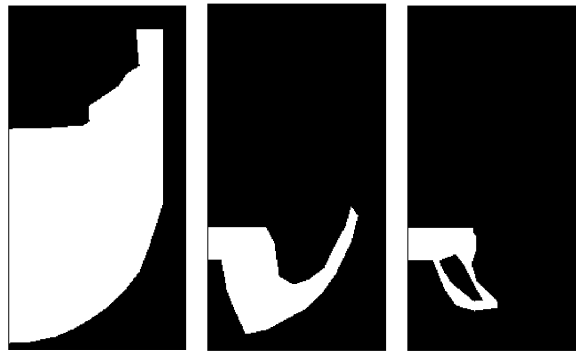
La découpe de la cuve en ces deux zones a été réalisée pour les trois conditions d'agitation auxquelles ont été acquises les mesures trajectographiques. Ces conditions sont pour rappel la vitesse de rotation N_{js} et $2 N_{js}$ pour le mobile TTP 125 et la vitesse de rotation N_{js} pour le mobile EE 150. Au total, il y a donc 9 découpes différentes de la cuve puisqu'il y a trois critères λ_K/d_p et trois conditions d'agitation étudiées.

Pour identifier la position des zones problématique et non problématique, le traitement suivant est appliqué. Premièrement, les zones correspondant aux valeurs supérieures ou inférieures à la valeur seuil du critère λ_K/d_p sont repérées dans les cartes λ_K/d_p établies à partir des mesures 3D P.I.V.. Les frontières entre la zone problématique et la zone non problématique sont ensuite lissées. De même, les petites inclusions de zone non problématique dans la zone problématique sont éliminées (Figure VI-1). La zone correspondant au masque appliqué sur le mobile dans les mesures 3D P.I.V. est incluse dans la zone problématique. Les zones

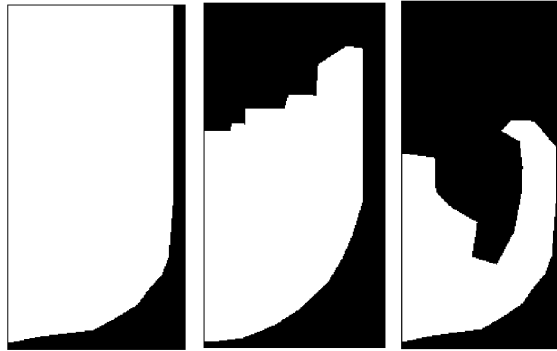
problématiques représentées par les surfaces blanches dans la Figure VI-2 sont ainsi obtenues pour les 9 cas étudiés.



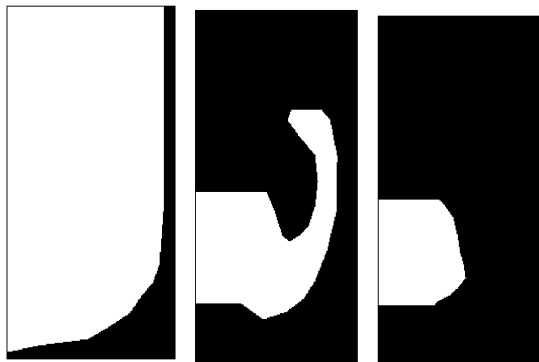
Figure VI-1 : (Gauche) Repérage de la zone problématique à partir des champs de l'échelle de Kolmogorov normée par le diamètre moyen des microporteurs (Droite) Lissage de la zone pour la rendre continue et régulière.



TTP 125, $N_{js}=50rpm$



TTP 125, 2 $N_{js}=100 rpm$



EE 150, $N_{js}=20rpm$

Figure VI-2 : Identification des zones (en blanc) potentiellement problématique pour le développement cellulaire. (Gauche) $\lambda_K/d_p=1$ (Milieu) $\lambda_K/d_p=2/3$ (Droite) $\lambda_K/d_p=1/2$.

La position de ces zones est ensuite exprimée dans un repère spatial commun aux mesures 3D P.I.V. et trajectographiques. Ce repère est en fait le repère cylindrique (r, θ, y) déjà présenté au Chapitre V (Section 3.1). Pour rappel, ce repère a son origine situé sur l'axe de rotation du mobile à même hauteur y que le repère spatial cartésien commun choisi lors de la modélisation du dispositif de trajectographie. Cependant, les informations acquises par des mesures P.I.V. sont limitées à un plan de la cuve (dans ce cas-ci, celui qui forme un angle de 45° avec le plan passant par les deux contre-pales) alors que les informations enregistrées par le dispositif de trajectographie sont mesurées dans l'ensemble du volume de la cuve. Il est donc nécessaire de déployer dans l'espace du repère cylindrique commun les surfaces correspondant aux zones problématiques identifiées à l'étape précédente en supposant une symétrie de révolution. Cette hypothèse avait été validée au Chapitre III. On obtient donc des volumes de type toroïdal. Le pourcentage du volume de la cuve qui est couvert par la zone labélisée comme problématique pour le développement cellulaire pour chaque condition d'agitation étudiée et pour chaque critère λ_k / d_p choisi est indiqué au Tableau VI-1. Comme conclu au Chapitre III, plus le critère est strict ($\lambda_k / d_p = 1$ étant le plus strict) et plus la vitesse de rotation du mobile est élevée, plus la zone problématique couvre un volume important de la cuve ; ce volume correspondant même à celui de toute la cuve pour deux des neuf cas étudiés.

Tableau VI-1 : Pourcentage du volume de la cuve couvert par la zone labélisée comme problématique pour le développement cellulaire suivant le critère λ_k / d_p choisi, le type de mobile et sa vitesse de rotation.

Mobile, Vitesse de rotation	% du volume de la cuve correspondant à la zone problématique lorsque :		
	$\lambda_k / d_p = 1$	$\lambda_k / d_p = 2/3$	$\lambda_k / d_p = 1/2$
TTP 125, N_{js} (50 rpm)	76.2	19.3	3.2
TTP 125, $2 N_{js}$ (100 rpm)	100	88.4	38.1
EE 150, N_{js} (20 rpm)	100	39.2	9.5

2.1.2 Découpe de la trajectoire

Les coordonnées des positions successives de la particule au cours du temps mesurées par trajectographie sont également exprimées dans le repère spatial cylindrique. Le résultat obtenu à chaque pas de temps a ensuite été labélisé en comparant les coordonnées (r, θ, y) de la position de la particule aux coordonnées (r, θ, y) de la zone problématique. Le label « 1 » a été donné aux pas de temps où la particule est située dans la zone problématique, le label « 0 » aux pas de temps où la particule est hors de la zone problématique et le label « 2 » a été donné aux pas de temps où la position de la particule n'a pas pu être mesurée. Tous ces pas de temps, ainsi que la position de la particule dans le repère cylindrique et le label attribué sont stockés dans une matrice M contenant donc 5 colonnes ($t, r, \theta, y, \text{label}$) et le nombre de lignes correspondant au temps total d'acquisition des trajectoires.

Pour calculer le temps de séjour de la particule dans la zone à chaque visite, il reste donc à identifier les pas de temps où la particule entre dans la zone, *i.e.* les lignes de la matrice M où on passe du label « 0 » au label « 1 » et les pas de temps où la particule ressort de la zone, *i.e.* les lignes de la matrice M où on passe du label « 1 » au label « 0 ». Cependant, les morceaux de trajectoire non mesurés (labélisés par 2) viennent compliquer la tâche. En effet, deux situations problématiques existent. La première correspond au cas où le morceau de trajectoire non mesuré couvre l'intervalle de temps où la particule entre ou sort de la zone. Les lignes successives de la matrice M sont donc labélisées « 0 » et puis « 2 » et puis « 1 » ou « 1 » et puis « 2 » et puis « 0 ». Dans ce cas se pose la question d'identifier le pas de temps t où la particule entre ou sort effectivement de la zone. La seconde situation problématique correspond au cas où un morceau de trajectoire est non mesuré pendant que la particule est dans la zone. Les lignes successives de la matrice M sont donc labélisées « 1 » et puis « 2 » et puis « 1 ». Il est légitime dans ce cas de se demander si la particule reste effectivement bien dans la zone pendant tous les pas de temps où sa position n'a pas pu être identifiée. Ces deux situations problématiques sont relativement fréquentes dans les données enregistrées (entre 30 et 50% du temps total d'acquisition), ce qui limite fortement le nombre de cas où il est possible de calculer le temps de séjour de la particule dans la zone problématique.

Pour parvenir à établir la distribution de temps de séjour DTS_{zone} sur un nombre suffisant de cas, les données mesurées par trajectographie ont été analysées une nouvelle fois afin d'exploiter l'information contenue dans les morceaux non mesurés de trajectoire. Une analyse visuelle de la matrice M a en effet mis en évidence que, dans de nombreux cas, il était possible de dire si la particule pendant le morceau de trajectoire non mesuré restait vraisemblablement dans la zone ou hors de la zone en se basant sur sa position avant et après et sur la longueur de l'intervalle de temps. Sur base de cette observation, un algorithme a été développé afin de traiter les deux situations problématiques présentées ci-dessus.

Dans la 2^{ème} situation problématique, où la particule semble rester dans la zone, l'algorithme transforme le label « 2 » en label « 1 » (ou en label « 0 ») lorsque les quatre conditions suivantes sont rencontrées :

- Les pas de temps avant et après le morceau de trajectoire non mesuré sont tous deux labélisés « 1 » (ou labélisés « 0 ») ;
- L'intervalle de temps où le morceau de trajectoire est non mesuré est inférieur à 2 s ;
- La position de la particule avant et après le morceau de trajectoire non mesuré est éloignée d'au moins 1 cm de la frontière qui sépare la zone problématique de la zone non problématique ;
- La vitesse de la particule, estimée sur base de ses positions avant et après le morceau de trajectoire non mesuré et sur base du temps qui sépare ces deux positions, est inférieure à la vitesse maximale mesurée par 3D P.I.V..

Dans la 1^{ère} situation problématique, puisque la particule entre ou sort de la zone pendant le morceau de trajectoire non mesuré, l'algorithme transforme certains pas de temps labélisés « 2 » en « 1 » et d'autres en « 0 », lorsque les conditions suivantes sont remplies :

- L'intervalle de temps où le morceau de trajectoire est non mesuré est inférieur à 2 s ;

- La vitesse de la particule pendant ce morceau de trajectoire non mesuré est inférieure à la vitesse maximale mesurée par 3D P.I.V..

Pour déterminer quel pas de temps est labélisé en « 1 » ou en « 0 », on fait l'hypothèse que la particule se déplace à vitesse constante pendant le morceau de trajectoire non mesuré. On compare ensuite les positions (r, θ, y) ainsi estimées aux frontières (r, θ, y) de la zone problématique.

Cette seconde analyse permet de récupérer un nombre de pas de temps labélisés « 2 » correspondant approximativement à 20% du temps total d'acquisition des trajectoires. Suivant les conditions d'agitation (mobile, vitesse de rotation), cela correspond de 33 à 50 % des pas de temps où la particule n'est pas identifiée. Ce traitement permet d'accroître significativement le nombre de visites considérées lors de l'analyse de la distribution de temps de séjour dans la zone puisqu'on passe d'un nombre compris entre 800 et 8 000, à un nombre compris entre 2 000 et 11 600, selon la trajectoire analysée.

Deux autres distributions de temps sont calculées simultanément à la distribution de temps de séjour de la particule dans les zones problématiques DTS_{zone} . Les calculs reposent sur le même principe que celui présenté ci-dessus. La première est la distribution de temps de séjour de la particule dans la zone non-problématique $DTS_{hors\ zone}$. Dans ce cas-ci, il faut repérer dans la matrice M , les pas de temps correspondant à des séquences de labels « 0 » encadrés par des labels « 1 » (*i.e.* 1 0...0 1). La seconde distribution est « la distribution de temps de cycle DT_{cycle} », qui correspond à la distribution de temps que met la particule pour réaliser un cycle complet « visite de la zone problématique - visite de la zone non problématique ». Il faut alors repérer dans la matrice M , les pas de temps correspondant à un cycle, *i.e.*, les séquences de labels 0 1...1 0...0 1.

2.2 Résultats

L'analyse des résultats est structurée en trois volets. Dans la première partie, l'influence de la valeur du critère λ_K / d_p est analysée, pour un mobile et une vitesse de rotation déterminés. Dans la deuxième partie, l'effet, sur les distributions, de la vitesse de rotation du mobile pour un mobile donné est discuté. Dans la troisième partie, les distributions obtenues pour les deux mobiles utilisés chacun à leur N_{js} sont comparées.

2.2.1 Effet du critère

Cette analyse est basée sur les résultats de la trajectoire obtenue lorsque le mobile TTP 125 tourne à la vitesse de rotation N_{js} . Le choix de ces conditions est guidé par le fait que, pour tous les critères λ_K / d_p , la cuve est effectivement divisée en une zone problématique et une zone non-problématique, ce qui n'est pas le cas pour les autres conditions d'agitation étudiées.

Les Figures VI-3 à VI-5 présentent les distributions des temps de séjour dans la zone problématique DTS_{zone} (gauche) et hors de la zone problématique $DTS_{hors\ zone}$ obtenues expérimentalement (résultats en bleu). L'axe des abscisses est exprimé en pas de temps des mesures trajectographiques et donc en $60^{\text{ème}}$ de seconde.

Les travaux de la littérature (Guha *et al.*, 2008 ; Guida *et al.*, 2012 ; Khopkar *et al.*, 2004 ; Rammohan *et al.*, 2001), indiquent que les distributions de temps de séjour dans la zone problématique DTS_{zone} et hors de la zone problématique $DTS_{hors\ zone}$ suivent une loi log-normale. Nous avons donc ajusté sur les distributions expérimentales obtenues les paramètres d'une loi log-normale (courbe en rouge sur les Figures VI-3 à VI-5), d'équation :

$$DTS = \frac{1}{t_s} \frac{1}{\sigma \sqrt{2\pi}} e^{-\frac{1}{2} \left(\frac{\ln(t_s) - \mu}{\sigma} \right)^2} \quad (VI-1)$$

Cet ajustement est réalisé à l'aide de la fonction « lsqcurvefit » de Matlab®. Les deux paramètres ajustés sont μ et σ . Ils correspondent respectivement à la moyenne et à l'écart-type de la loi normale correspondant à la distribution de $\ln(t_s)$ où t_s est le temps de séjour de la particule dans la zone (ou hors de la zone) problématique à chaque visite. La moyenne de la loi-log normale peut être calculée à partir des deux paramètres ajustés selon :

$$\mu_{DTS} = e^{(\mu + \frac{\sigma^2}{2})} \quad (VI-2)$$

Les valeurs obtenues pour ces trois grandeurs (μ , σ , μ_{DTS}) sont présentées dans le Tableau VI-3.

Tableau VI-2 : Valeurs des paramètres μ et σ obtenus par ajustement sur les distributions expérimentales d'une loi log-normale. Valeurs de la moyenne de la loi log-normale estimée à partir des valeurs des paramètres μ et σ .

		μ ln(s)	$\pm \Delta \mu$ ln(s)	σ ln (s)	$\pm \Delta \sigma$ ln (s)	μ_{DTS} (1/60 ^{ème} s)
TTP 125 N_{js} $\lambda_K/d_p=1/2$	DTS_{zone}	2.61	0.01	0.89	0.01	20
	$DTS_{hors\ zone}$	3.24	0.02	0.92	0.02	39
TTP 125 N_{js} $\lambda_K/d_p=2/3$	DTS_{zone}	4.47	0.03	1.26	0.03	193
	$DTS_{hors\ zone}$	4.73	0.03	1.51	0.03	356
TTP 125 N_{js} $\lambda_K/d_p=1$	DTS_{zone}	4.93	0.05	2.20	0.04	732
	$DTS_{hors\ zone}$	4.59	0.02	1.26	0.02	227

La comparaison des résultats expérimentaux et des lois ajustées montrent, qu'en règle générale, les distributions de temps de séjour obtenues expérimentalement sont proches de loi log-normale.

Une seconde petite « bosse » apparaît cependant dans les distributions expérimentales pour les grands temps de séjour t_s . Nous ne sommes pas à même d'expliquer ce second maximum. Deux causes sont envisageables : l'algorithme présenté à la section précédente pourrait générer artificiellement des temps de séjour longs lors de la récupération des pas de temps

correspondant aux morceaux de trajectoire où la particule n'est pas détectée. Inversement, il est possible que les visites de la particule dans la zone correspondant à des temps de séjour très courts soient moins bien détectées.

Notons que la distribution de temps de séjour de la particule hors de la zone dans le cas où le critère sélectionné est $\lambda_K / d_p = 1/2$ s'écarte assez fortement de la loi log-normal ajustée (Figure VI-3). Ce cas est un peu particulier en raison de la structure de la zone problématique. La Figure VI-2 montre en effet qu'une petite zone non problématique est incrustée au centre du volume correspondant à la zone problématique. Les conséquences de cette répartition particulière sont discutées par la suite.

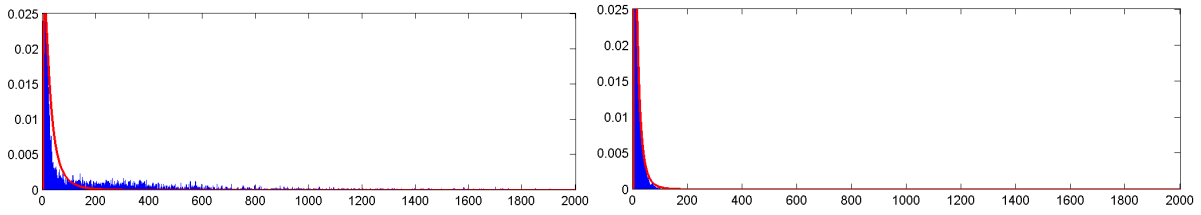


Figure VI-3 : Distribution de temps de séjour dans la zone problématique DTS_{zone} (gauche) et dans la zone non problématique $DTS_{hors\ zone}$ (droit) lorsque le mobile TTP 125 tourne à la vitesse de rotation N_{js} et que le critère λ_K/d_p vaut $1/2$. (Bleu) Résultats expérimentaux (rouge) Loi log-normal ajustée.

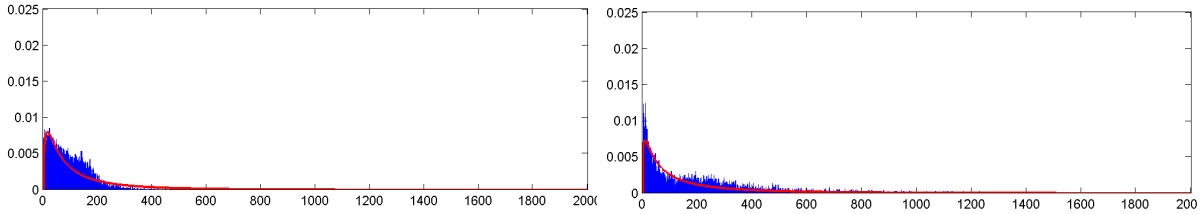


Figure VI-4 : Distribution de temps de séjour dans la zone problématique DTS_{zone} (gauche) et dans la zone non problématique $DTS_{hors\ zone}$ (droit) lorsque le mobile TTP 125 tourne à la vitesse de rotation N_{js} et que le critère λ_K/d_p vaut $2/3$. (Bleu) Résultats expérimentaux (rouge) Loi log-normal ajustée.

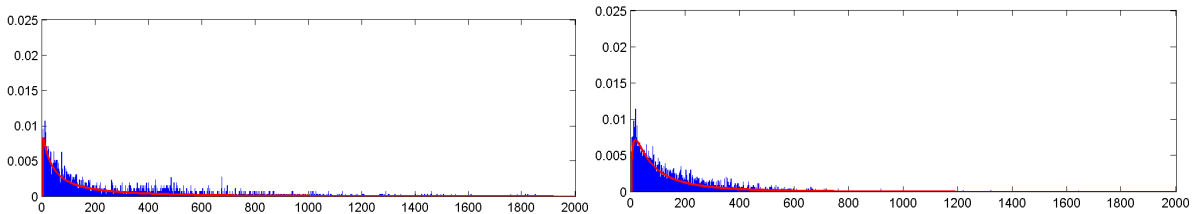


Figure VI-5 : Distribution de temps de séjour dans la zone problématique DTS_{zone} (gauche) et dans la zone non problématique $DTS_{hors\ zone}$ (droit) lorsque le mobile TTP 125 tourne à la vitesse de rotation N_{js} et que le critère λ_K/d_p vaut 1 . (Bleu) Résultats expérimentaux (rouge) Loi log-normal ajustée.

Les distributions de temps de cycle DT_{cyle} sont présentées dans les Figures VI-6 à VI-8. On constate qu'elles semblent être la somme des deux distributions DTS_{zone} et $DTS_{hors\ zone}$ car elles présentent des caractéristiques de chacune d'entre elles. Vu la définition de la distribution des temps de cycle, cet observation semble tout à fait plausible.

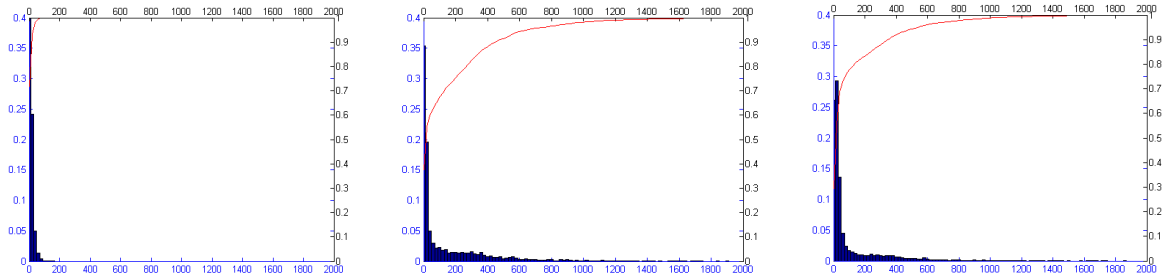


Figure VI-6 : (Gauche) DTS_{zone} (milieu) $DTS_{hors\ zone}$ (droite) DT_{cycle} obtenues lorsque le mobile TTP 125 tourne à la vitesse de rotation N_{js} et que le critère λ_k/d_p vaut $1/2$.

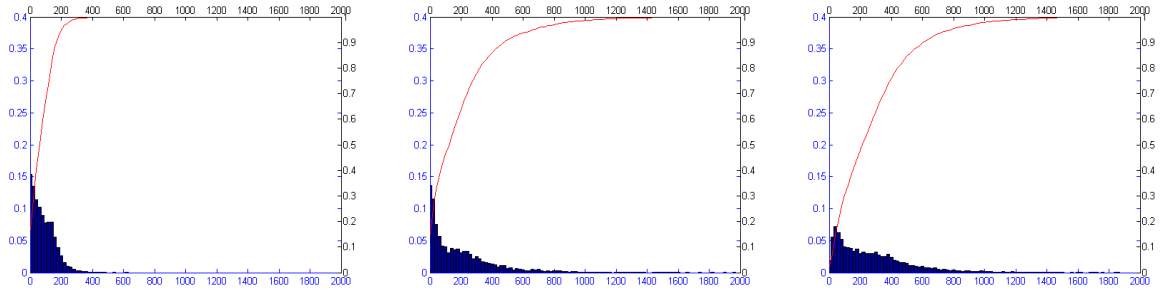


Figure VI-7 : (Gauche) DTS_{zone} (milieu) $DTS_{hors\ zone}$ (droite) DT_{cycle} obtenues lorsque le mobile TTP 125 tourne à la vitesse de rotation N_{js} et que le critère λ_k/d_p vaut $2/3$.

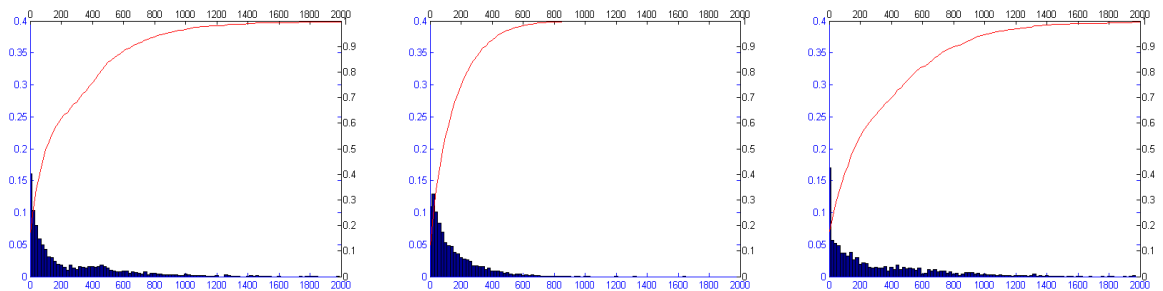


Figure VI-8 : (Gauche) DTS_{zone} (milieu) $DTS_{hors\ zone}$ (droite) DT_{cycle} obtenues lorsque le mobile TTP 125 tourne à la vitesse de rotation N_{js} et que le critère λ_k/d_p vaut 1.

Pour quantifier les distributions de temps de séjour dans la zone problématique et hors de la zone problématique, la moyenne a été estimée à partir de la courbe ajustée. Les percentiles 25, 50, 75 et 99 ont également été extraits des données expérimentales et rassemblés dans le Tableau VI-3.

Un lien assez évident entre le temps de séjour à chaque visite et le volume des zones respectives apparaît. En effet, plus une zone a un volume important, plus la distribution de temps de séjour est étalée et plus la moyenne et les percentiles de cette distribution sont élevés. Cette constatation s'applique aussi bien pour les distributions de temps de séjour de la particule dans la zone problématique DTS_{zone} que pour leurs homologues dans la zone non problématique $DTS_{hors\ zone}$. Ainsi, si on compare les résultats obtenus pour le critère $\lambda_k/d_p=1$ et le critère $\lambda_k/d_p=2/3$, on constate que le pourcentage du volume de la cuve occupé par la zone problématique passe de 76.2 % à 19.3 % (Tableau VI-1). La moyenne de la distribution

de temps de séjour dans la zone DTS_{zone} chute de 12.18 s à 3.21 s. Les percentiles de cette distribution diminuent tous également. Tandis que la moyenne de la distribution de temps de séjour hors de la zone $DTS_{hors\ zone}$ augmente de 3.77 s à 5.93 s ainsi que les percentiles de cette distribution.

Les rapports des tailles de la zone problématique et de la zone non problématique s'inversent entre ces 2 critères, *i.e.* pour le critère $\lambda_k / d_p = 2/3$, la zone non problématique est prépondérante dans la cuve tandis que pour le critère $\lambda_k / d_p = 1$, la zone problématique est prépondérante. Au vu du lien établi dans le paragraphe précédent, la conséquence de cette inversion est que la particule passe en moyenne à chaque visite un temps proportionnellement plus long dans la zone non problématique que dans la zone problématique ($\mu_{DTS, hors\ zone} = 5.93$ s et $\mu_{DTS, zone} = 3.21$ s) lorsque $\lambda_k / d_p = 2/3$. C'est l'inverse lorsque $\lambda_k / d_p = 1$ ($\mu_{DTS, hors\ zone} = 3.78$ s et $\mu_{DTS, zone} = 12.2$ s).

Tableau VI-3 : Comparaison des distributions de temps de séjour dans la zone problématique DTS_{zone} et hors de la zone problématique $DTS_{hors\ zone}$ ainsi que les distributions de temps de cycle DT_{cycle} obtenues pour le mobile TTP 125 tournant à la vitesse de rotation N_{js} pour les critères λ_k / d_p égale à $1/2$, $2/3$ et 1.

		μ_{DTS} (1/60 ^{ème} s)	P_{25} (1/60 ^{ème} s)	P_{50} (1/60 ^{ème} s)	P_{75} (1/60 ^{ème} s)	P_{99} (1/60 ^{ème} s)
TTP 125 N_{js} $\lambda_k / d_p = 1/2$	DTS_{zone}	20	8	14	23	70
	$DTS_{hors\ zone}$	39	16	31	215	1233
	DT_{cycle}		20	36	92	1075
TTP 125 N_{js} $\lambda_k / d_p = 2/3$	DTS_{zone}	193	34	80	140	310
	$DTS_{hors\ zone}$	356	40	142	297	1118
	DT_{cycle}		37	139	340	1152
TTP 125 N_{js} $\lambda_k / d_p = 1$	DTS_{zone}	732	36	123	406	1448
	$DTS_{hors\ zone}$	227	43	103	222	702
	DT_{cycle}		49	181	496	1691

Pour la distribution de temps de séjour dans la zone problématique, les remarques faites ci-dessus sont de nouveau observées pour le critère $\lambda_k / d_p = 1/2$. Par contre, on observe que malgré l'augmentation du volume de la zone non problématique (il passe de 80.66% pour $\lambda_k / d_p = 2/3$ à 96.75% pour $\lambda_k / d_p = 1/2$), la moyenne de la distribution de temps de séjour dans cette zone diminue ainsi que les percentiles 25 à 75. Ce phénomène est dû à la manière dont les zones problématiques et non problématique sont agencées dans ce cas. Les temps de séjour de la particule, lorsqu'elle traverse la partie de la zone non problématique incluse dans la zone problématique, sont très courts, d'autant plus que cette zone correspond au jet des pales du mobile. Ces temps courts déséquilibrent la distribution de temps de séjour, l'éloignant d'une loi log-normale et entraînant donc des valeurs faibles de la moyenne et des percentiles.

Les percentiles des distributions de temps de cycle DT_{cycle} sont également présentés dans le Tableau VI-3 pour les trois valeurs du critère λ_k / d_p étudiées. Les résultats présentés montrent clairement que, plus la zone problématique est grande, plus les valeurs de chaque percentile augmentent. Les distributions de temps de cycle s'étalent donc vers la droite. Ce résultat est intéressant car il met en évidence une caractéristique de l'écoulement en cuve agitée. Lorsqu'elle se déplace dans la cuve, la particule revient périodiquement dans la zone balayée par le mobile en traçant des boucles. Le temps écoulé entre deux passages dans la zone balayée par le mobile est appelé le temps de circulation. Tout comme on établit une distribution de temps de séjour, on peut établir une distribution de temps de circulation. On pourrait également imaginer de couper la trajectoire chaque fois que la particule passe dans la zone balayée par le mobile. Pour caractériser les morceaux de trajectoire ainsi obtenus, on pourrait établir une distribution des longueurs de trajectoire appelé ici la distribution de longueur de boucle de recirculation vu la manière dont on l'a établie. Il est fort probable que pour les boucles les plus longues, la particule met un temps de circulation plus grand. Or, vu la position du mobile et la structure de l'écoulement moyen (Chapitre III), la particule dessine une boucle plus longue dans la cuve lorsqu'elle visite le haut de celle-ci. Elle dessine des boucles plus courtes lorsqu'elle reste dans la moitié inférieure de la cuve. Cette courte explication aide à comprendre pourquoi les temps de cycle sont d'autant plus longs que la zone problématique est grande et donc que la valeur du critère λ_k / d_p est stricte. En effet, la zone non problématique, comme le montre la Figure VI-2, est de plus en plus cantonnée dans la partie supérieure de la cuve. La particule met donc plus de temps pour aller dans cette zone et, dès lors, plus de temps pour boucler un cycle.

Ainsi, en synthèse, on constate que plus la valeur sélectionnée du critère est stricte ($\lambda_k / d_p = 1$ étant le plus strict), plus la particule a de chance de passer un temps long à chaque visite dans la zone problématique, ce qui est en accord avec l'augmentation du volume de celle-ci. Puisque la position de la zone non problématique est de plus en plus cantonnée dans la partie supérieure de la cuve, la particule mettra également un temps plus long pour réaliser un cycle. Elle passera aussi proportionnellement un temps plus long dans la zone problématique que dans la zone non problématique à chaque cycle vu l'évolution du rapport des volumes des zones correspondantes.

Terminons cette section par un mot sur le choix des valeurs du critère. Ce choix des valeurs du critère λ_k / d_p est basé sur les valeurs les plus fréquemment citées dans la littérature. Ces dernières proviennent surtout de l'hypothèse qu'il ne peut y avoir d'interaction entre les microporteurs et les tourbillons environnants que si ces derniers ont une taille inférieure ou égale à celle des microporteurs. Dans le cas contraire, le microporteur suit simplement l'écoulement local généré par le tourbillon. A notre connaissance, aucun auteur n'a établi une valeur seuil du critère λ_k / d_p basé à la fois sur les résultats des cultures de cellules animales sur microporteurs en cuve agitée et sur la connaissance de la distribution d'échelle de Kolmogorov au sein du bioréacteur. Dès lors, il faut plutôt interpréter la méthodologie

développée ici comme un moyen de quantifier et de mettre en évidence l'évolution de la taille des zones et des distributions de temps associées en fonction de la valeur du critère choisie.

Vu la manière dont ces grandeurs évoluent, Il faut espérer, qu'en pratique, les tourbillons susceptibles d'endommager les cellules fixées sur les microporteurs ont une taille inférieure ou égale à $d_p/2$, car sinon cela signifierait que les cellules pourraient déjà subir un stress hydrodynamique important à la vitesse de rotation N_{js} .

2.2.2 Effet de la vitesse de rotation du mobile

Cet effet est étudié en comparant la taille des zones problématiques et les distributions DTS_{zone} , $DTS_{hors\ zone}$, DT_{cycle} obtenues lorsque le mobile TTP 125 tourne à la vitesse de rotation N_{js} et $2 N_{js}$.

Pour le critère $\lambda_k/d_p=1$, la comparaison est rapide car, à la vitesse de rotation $2 N_{js}$, la zone problématique couvre 100% du volume de la cuve. L'effet potentiellement délétère d'une augmentation de la vitesse de rotation sur les performances de la culture est dans ce cas évident.

Tableau VI-4 : Comparaison des distributions de temps de séjour dans la zone problématique DTS_{zone} et hors de la zone problématique $DTS_{hors\ zone}$ ainsi que les distributions de temps de cycle DT_{cycle} obtenues pour le mobile TTP 125 tournant aux vitesses de rotation N_{js} et $2 N_{js}$ et pour les critères λ_k/d_p égaux à $1/2$ et $2/3$.

		μ_{DTS} (1/60 ^{ème} s)	p_{25} (1/60 ^{ème} s)	p_{50} (1/60 ^{ème} s)	p_{75} (1/60 ^{ème} s)	p_{99} (1/60 ^{ème} s)
TTP 125 N_{js} $\lambda_k/d_p=1/2$	DTS_{zone}	20	8	14	23	70
	$DTS_{hors\ zone}$	39	16	31	215	1233
	DT_{cycle}		20	36	92	1075
TTP 125 $2 N_{js}$ $\lambda_k/d_p=1/2$	DTS_{zone}	412	32	89	132	324
	$DTS_{hors\ zone}$	138	46	78	142	638
	DT_{cycle}		68	146	234	717
TTP 125 N_{js} $\lambda_k/d_p=2/3$	DTS_{zone}	193	34	80	140	310
	$DTS_{hors\ zone}$	356	40	142	297	1118
	DT_{cycle}		37	139	340	1152
TTP 125 $2 N_{js}$ $\lambda_k/d_p=2/3$	DTS_{zone}	1532	29	122	338	1290
	$DTS_{hors\ zone}$	112	31	63	112	300
	DT_{cycle}		43	147	362	1312

Cet effet délétère est de nouveau mis en évidence lorsque l'on compare les distributions DTS_{zone} et DT_{cycle} pour les critères $\lambda_k/d_p=1/2$ et $\lambda_k/d_p=2/3$ (Tableau VI-4). En effet, on constate que la moyenne et les percentiles des ces distributions obtenus à la vitesse de rotation $2 N_{js}$ sont nettement plus élevés que ceux obtenus à la vitesse de rotation N_{js} . Or, on aurait pu imaginer que puisque la vitesse de rotation du mobile est deux fois plus élevée, la particule devrait circuler plus rapidement dans la cuve, rester moins longtemps dans un volume donné et boucler plus rapidement des cycles. On constate que ce n'est pas le cas à cause de l'augmentation du volume des zones problématiques avec la vitesse de rotation du mobile

(respectivement 3.2% et 19.3% du volume de la cuve à N_{js} et 38.1% et 88.4% à $2 N_{js}$) et à cause de l'agencement spatiale de la zone problématique et de la zone non problématique. En effet, pour la vitesse de rotation $2 N_{js}$, la particule doit visiter le haut de la cuve pour sortir de la zone problématique et pour boucler un cycle. Comme expliqué au point précédent, cela requiert de tracer une boucle plus longue et donc un temps de circulation plus long aussi.

En synthèse, augmenter la vitesse de rotation du mobile peut avoir un effet potentiellement délétère sur les performances de la culture car le volume de la zone problématique s'étend rapidement, ce qui implique que la particule met des temps globalement plus longs pour réaliser un cycle complet et que les temps passés dans la zone problématique s'allongent globalement.

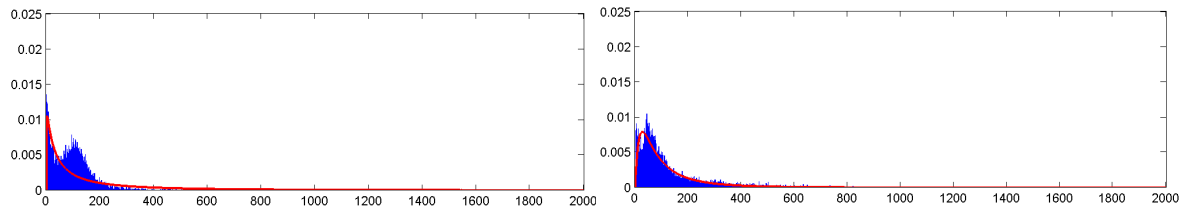


Figure VI-9 : Distribution de temps de séjour dans la zone problématique DTS_{zone} (gauche) et dans la zone non problématique $DTS_{hors\ zone}$ (droit) lorsque le mobile TTP 125 tourne à la vitesse de rotation $2 N_{js}$ et que le critère λ_K/d_p vaut 1/2. (Bleu) Résultats expérimentaux (rouge) Loi log-normal ajustée.

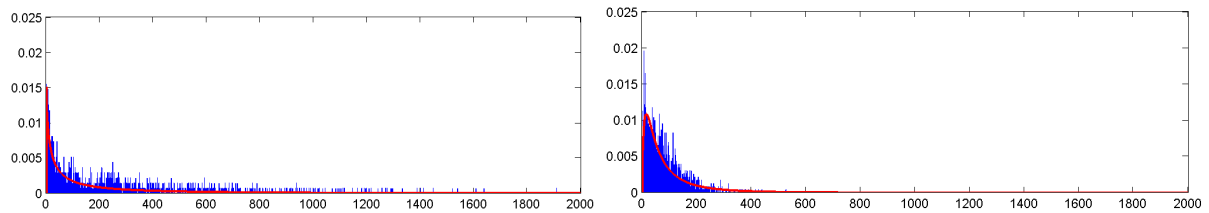


Figure VI-10 : Distribution de temps de séjour dans la zone problématique DTS_{zone} (gauche) et dans la zone non problématique $DTS_{hors\ zone}$ (droit) lorsque le mobile TTP 125 tourne à la vitesse de rotation $2 N_{js}$ et que le critère λ_K/d_p vaut 2/3. (Bleu) Résultats expérimentaux (rouge) Loi log-normal ajustée.

2.2.3 Effet du type de mobile

Cet effet est étudié en comparant la taille des zones problématiques et les distributions DTS_{zone} , $DTS_{hors\ zone}$, DT_{cycle} obtenues lorsque le mobile TTP 125 et le mobile EE 150 tournent chacun à leur vitesse de rotation N_{js} .

Vu le lien entre le temps de séjour à chaque visite et le volume des zones problématiques observé au Point 2.2.1, on aurait tendance très vite à conclure que mobile EE 150 est moins « bon » pour la culture de cellules animales sur microporteurs que le mobile TTP 125 car les pourcentages de volume de cuve correspondant à la zone problématique (Tableau VI-1) sont plus élevés pour le premier que pour le deuxième mobile pour toutes les valeurs du critère λ_k / d_p étudiées. On obtient même une valeur de 100% lorsque le critère λ_k / d_p est égal à 1. Analysons les moyennes et percentiles des distributions DTS_{zone} , $DTS_{hors\ zone}$ obtenues lorsque $\lambda_k / d_p = 2/3$ pour confirmer cette tendance (Tableau VI-5). La moyenne et les percentiles des

distributions $DTS_{hors\ zone}$ suivent bien ce qui était attendu car les valeurs obtenues pour le mobile TTP 125 sont plus élevées que celles obtenues pour le mobile EE 150, ce qui est en accord avec les volumes respectifs des zones non problématiques correspondantes. Par contre, on constate que la moyenne et les percentiles des distributions DTS_{zone} sont très proches. Ce résultat est surprenant surtout lorsque l'on compare les volumes des zones problématiques qui valent respectivement 39.2 % pour le mobile EE 150 et 19.3 % pour le mobile TTP 125.

On ne peut toutefois pas exclure que ce résultat provienne d'un biais dans la distribution DTS_{zone} établie pour le mobile EE 150 en raison du temps d'acquisition relativement faible et du grand nombre de pas où la particule n'est pas détectée.

Il faut cependant garder en mémoire que le temps total d'acquisition pour cette trajectoire est seulement de 12 h à cause de la panne de la caméra 1 et que le nombre de pas de temps où la particule n'est pas détectée est plus important pour ce mobile que pour le mobile TTP 125.

Ces deux problèmes se répercutent d'ailleurs dans les distributions DTS_{zone} , $DTS_{hors\ zone}$, DT_{cycle} obtenues lorsque le critère $\lambda_k / d_p = 1/2$ (Figure VI-11). Dans ce cas en effet, les distributions obtenues semblent « bruitées » car elles sont établies sur un nombre de données relativement restreint compris entre 300 et 800 visites contre 2000 à 12 000 visites pour les distributions établies dans les autres conditions étudiées. Ainsi, pour répondre formellement à la question, il sera nécessaire d'avoir des trajectoires continues sur des temps d'acquisition d'au moins 40h.

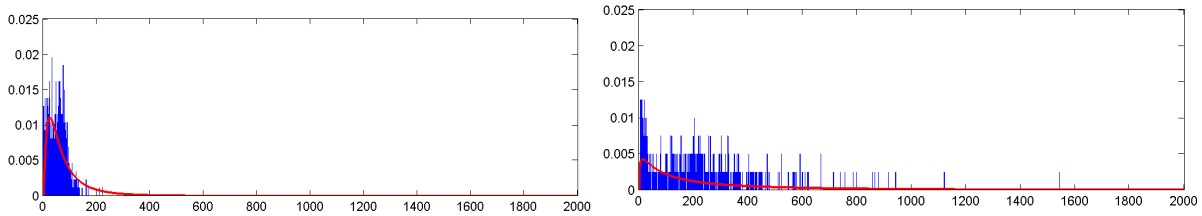


Figure VI-11 : Distribution de temps de séjour dans la zone problématique DTS_{zone} (gauche) et dans la zone non problématique $DTS_{hors\ zone}$ (droit) lorsque le mobile EE 150 tourne à la vitesse de rotation N_{js} et que le critère λ_k/d_p vaut 1/2. (Bleu) Résultats expérimentaux (rouge) Loi log-normal ajustée.

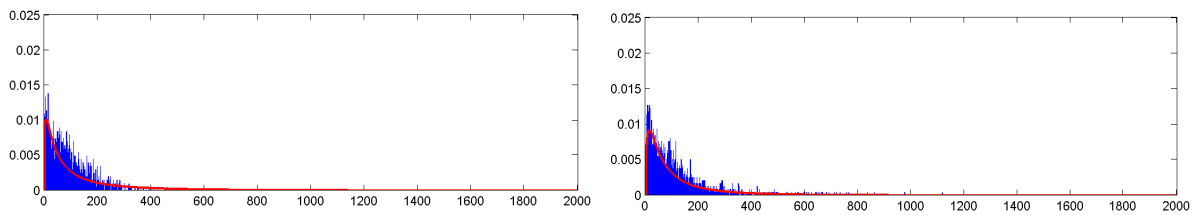


Figure VI-12 : Distribution de temps de séjour dans la zone problématique DTS_{zone} (gauche) et dans la zone non problématique $DTS_{hors\ zone}$ (droit) lorsque le mobile EE 150 tourne à la vitesse de rotation N_{js} et que le critère λ_k/d_p vaut 2/3. (Bleu) Résultats expérimentaux (rouge) Loi log-normal ajustée.

Lorsque l'on compare les percentiles des distributions DT_{cycle} lorsque $\lambda_k / d_p = 2/3$, on constate que ceux obtenus pour le mobile EE 150 sont plus petits que ceux obtenus pour le mobile TTP 125. Ces résultats semblent donc montrer que le mobile TTP 125 est mieux adapté pour la culture de cellules animales sur microporteurs que le mobile EE 150 car, d'une part la particule fait des cycles plus longs, *i.e.*, elle revient dans la zone problématique à une

fréquence moindre et, d'autre part, elle reste globalement un temps plus long dans la zone non problématique à chaque fois qu'elle la visite. Cette conclusion devrait cependant être confirmée par une validation de la distribution DTS_{zone} obtenue pour le mobile EE 150.

Tableau VI-5 : Comparaison des distributions de temps de séjour dans la zone problématique DTS_{zone} et hors de la zone problématique $DTS_{hors\ zone}$ ainsi que les distributions de temps de cycle DT_{cycle} obtenues pour les mobiles TTP 125 et EE 150 tournant à leur vitesse de rotation N_{js} et pour le critère λ_K/d_p égale à $\frac{2}{3}$.

		μ_{DTS} (1/60 ^{ème} s)	P_{25} (1/60 ^{ème} s)	P_{50} (1/60 ^{ème} s)	P_{75} (1/60 ^{ème} s)	P_{99} (1/60 ^{ème} s)
TTP 125 N_{js} $\lambda_K/d_p = \frac{2}{3}$	DTS_{zone}	193	34	80	140	310
	$DTS_{hors\ zone}$	356	40	142	297	1118
	DT_{cycle}		37	139	340	1152
EE 150 N_{js} $\lambda_K/d_p = \frac{2}{3}$	DTS_{zone}	210	28	70	122	320
	$DTS_{hors\ zone}$	152	34	80	143	579
	DT_{cycle}		21	105	196	607

3 Superposition des trajectoires et des champs de la moyenne des contraintes normales

3.1 Méthodologie

Au Chapitre III (Section 5), nous avons établi, pour chaque condition d'agitation (mobile, vitesse de rotation), le champ de la moyenne des contraintes normales τ_N à partir des champs de contraintes normales dans les trois directions τ_{xx} , τ_{yy} , τ_{zz} , ces dernières étant estimées par le produit de la densité du fluide et les composantes principales du tenseur de Reynolds. Dans cette section, nous allons superposer la trajectoire suivie par la particule à ce champ afin d'établir la distribution des contraintes normales rencontrées par la particule le long de sa trajectoire.

Tout comme pour l'établissement des distributions de temps de séjour et de temps de retour, la première étape pour établir la distribution des contraintes normales est d'exprimer les données eulériennes et lagrangiennes dans un même repère spatial, qui est de nouveau le repère cylindrique dont l'origine est située sur l'axe de rotation du mobile. Pour chaque pas de temps, la valeur de τ_N correspondant à la coordonnée (r, y) de la particule est déterminée. Pour les pas de temps où la position de la particule est inconnue, une valeur de NaN (« Not a Number ») est indiquée. Ce résultat est de nouveau stocké dans une matrice M contenant 5 colonnes $(t, r, \theta, y, \tau_N)$ et dont le nombre de lignes correspond au temps total d'acquisition des trajectoires.

La distribution des contraintes normales rencontrées par la particule le long de sa trajectoire est ensuite établie uniquement sur les résultats où la particule est dans la moitié de la cuve qui est caractérisée par les valeurs de θ comprises en $-\pi/2$ et $\pi/2$. Nous avons en effet montré au chapitre précédent que les informations perdues suite à la « perte » de la particule

sont minimales dans cette moitié de cuve, alors que ce n'est pas le cas dans l'autre moitié. Nous avons également conclu qu'au vu de la géométrie de la cuve, cette moitié de cuve était représentative de ce qui se passe dans l'ensemble de l'écoulement.

3.2 Résultats

La Figure VI-13 montre l'évolution de la moyenne des contraintes normales rencontrée par la particule le long de sa trajectoire pendant une durée de 30 min. Les intervalles de temps correspondant aux morceaux de trajectoires non mesurés ne viennent pas fausser ces graphiques car, comme nous avons associé une valeur de NaN à ces intervalles de temps, le trait bleu est simplement discontinu dans ces cas.

Ces trois graphiques mettent en évidence à quel point la particule est soumise à un environnement hydrodynamique fluctuant le long de sa trajectoire. Qualitativement, on remarque aussi que l'environnement rencontré est d'autant plus fluctuant que la vitesse de rotation du mobile TTP 125 est élevée. On constate en effet que l'amplitude des fluctuations augmente (elle passe de 1.8 N m^{-2} à 7 N m^{-2}) et que les intervalles de temps entre les pics voisins diminuent quand la vitesse de rotation passe de N_{js} à $2 N_{js}$.

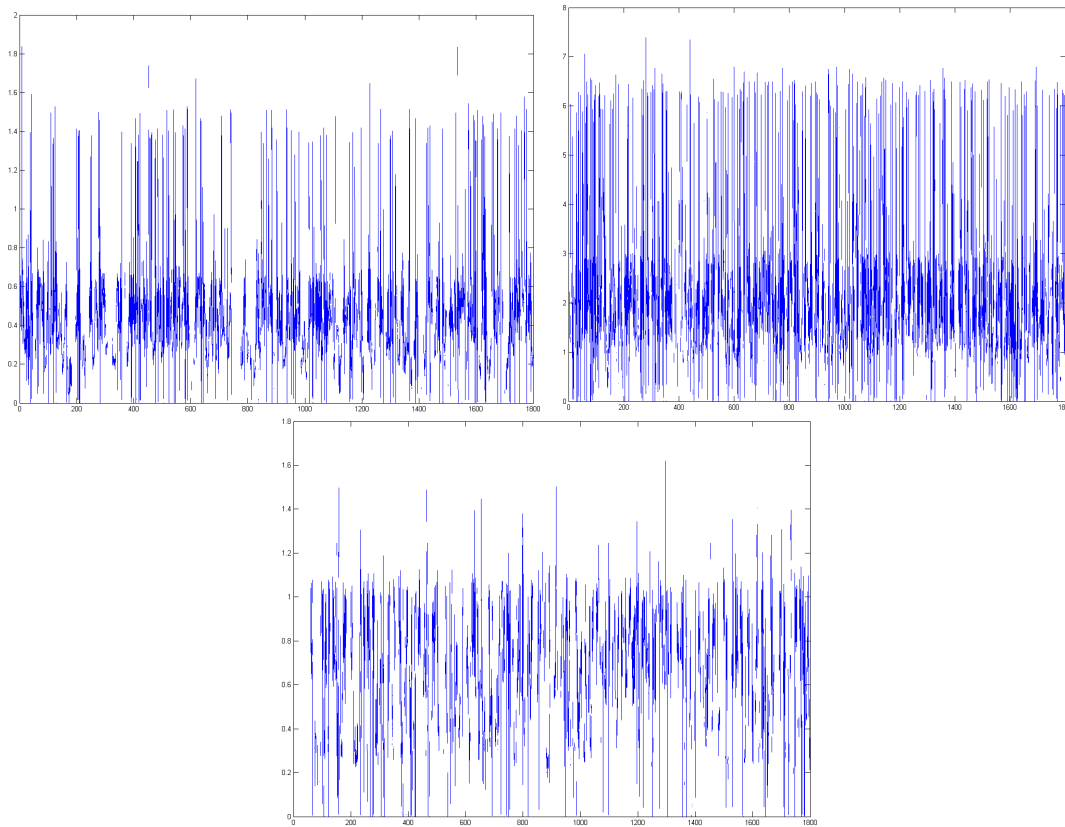


Figure VI-13 : Evolution avec le temps de la moyenne des contraintes normales rencontrées par la particule le long de sa trajectoire. (Haut, gauche) Mobile TTP 125, N_{js} (Haut, droite) Mobile TTP 125, $2 N_{js}$, (Bas, milieu) EE 150, N_{js} .

Si on établit la distribution de la moyenne des contraintes normales rencontrée par la particule le long de sa trajectoire en se basant uniquement sur les résultats obtenus lorsque la particule

est dans la moitié de cuve où la coordonnée θ est comprise en $-\pi/2$ et $\pi/2$, un résultat intéressant peut être mis en évidence : la distribution obtenue sur base des résultats lagrangiens (en bleu dans la Figure VI-14) coïncide avec la distribution établie à partir du champ eulérien (en rouge dans la Figure VI-14). Ce résultat est une sorte de validation car il montre que la particule se déplace bien en tous les points des plans axiaux, que l'isoprobabilité de présence est bien retrouvée et que les trajectoires relatives à la moitié de cuve sont bien représentatives de ce qui se passerait pour l'ensemble de la cuve.

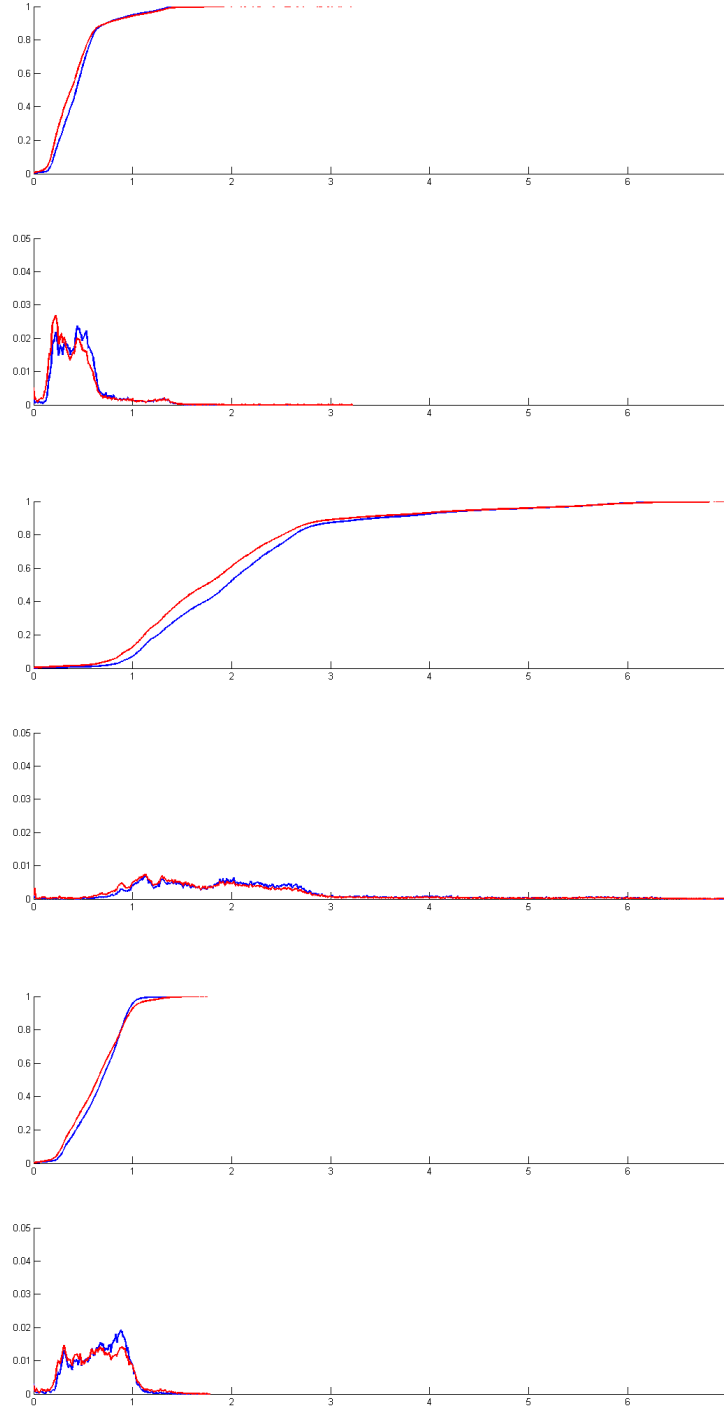


Figure VI-14 : Fonction de répartition et distribution de la moyenne des contraintes normales (bleu) obtenues le long de la trajectoire (rouge) obtenues à partir du champ eulérien. (Haut) Mobile TTP 125, N_{js} (Milieu) Mobile TTP 125, $2 N_{js}$ (Bas) Mobile EE 150, N_{js} .

On ne peut malheureusement pas aller plus loin dans l'analyse des graphiques présentant l'évolution de τ_N en fonction du temps et en fonction des conditions d'agitation à cause des morceaux de trajectoire non-mesurés. Cette analyse, qui nécessite de disposer d'une trajectoire continue, permettrait d'obtenir des informations précieuses. On pourrait imaginer par exemple de réaliser une analyse spectrale du signal. On pourrait également établir la distribution des fréquences où la particule est soumise à un niveau donné de contrainte normale. On pourrait aussi déterminer le niveau moyen de contrainte subi entre deux passages dans la zone à haute contrainte. L'impact des conditions d'agitation sur ces grandeurs pourrait être quantifié.

4 Conclusion

Dans ce chapitre, les informations eulériennes déterminées au Chapitre III sont combinées aux informations lagrangiennes. Elles sont analysées à l'aide de deux outils :

Le premier outil utilise une division du volume de la cuve en deux zones sur base des données eulériennes : la première zone est labélisée comme potentiellement problématique pour le développement cellulaire, l'autre est labélisée comme non problématique. Cette découpe est basée sur la distribution spatiale du *ratio* entre l'échelle de Kolmogorov λ_K et la taille moyenne des microporteurs d_p . Trois valeurs seuils de ce *ratio* ont été sélectionnées pour diviser la cuve : 1, $\frac{2}{3}$ et $\frac{1}{2}$. Les données lagrangiennes servent quant à elles à établir les distributions de temps de séjour de la particule dans chacune des deux zones ainsi que la distribution de temps mis par la particule pour réaliser un cycle complet « visite de la zone problématique – visite de la zone non problématique ». L'analyse des distributions ainsi obtenues montrent que :

- Plus le critère λ_K / d_p est strict ($\lambda_K / d_p = 1$ étant le plus strict), plus la zone problématique est étendue et plus la particule a de chance de passer un temps long à chaque visite dans cette zone. Puisque la zone non problématique est de plus en plus cantonnée dans la partie supérieure de la cuve, la particule met également un temps plus long pour réaliser un cycle. Elle passe aussi proportionnellement un temps plus long dans la zone problématique que dans la zone non problématique à chaque cycle vu l'évolution du rapport des volumes des zones correspondantes.
- Lorsque la vitesse de rotation du mobile augmente, la taille de la zone problématique s'étend rapidement, cantonnant la zone non problématique dans la partie supérieure de la cuve. La conséquence est que, même si la particule se déplace plus vite dans la cuve, elle met des temps globalement plus longs pour réaliser un cycle et elle passe également un temps plus long dans la zone problématique à chaque visite.
- La comparaison des distributions de temps obtenues pour chaque mobile à la vitesse de rotation N_{js} semble indiquer que le mobile TTP 125 est mieux adapté pour la culture de cellules animales sur microporteurs que le mobile EE 150 car, d'une part, la particule fait globalement des cycles plus longs, *i.e.*, elle revient dans la zone problématique à une fréquence moindre et, d'autre part, elle reste en moyenne un temps plus long dans la zone non problématique à chaque fois qu'elle la visite. .

Le deuxième outil consiste à superposer les trajectoires (données lagrangiennes) aux champs eulériens de la moyenne des contraintes normales. Cet outil permet surtout de se rendre compte des très nombreuses fluctuations de l'environnement hydrodynamique auquel la particule est soumise au cours du temps. L'analyse quantitative des données obtenues avec cet outil n'a cependant pas pu être poussée très loin à cause des très nombreux morceaux de trajectoire non-mesurés.

Dans ce chapitre, nous avons présenté deux outils d'analyse des trajectoires. Or, de nombreux autres outils pourraient être développés pour exploiter toute la richesse des informations contenues dans une trajectoire. Il n'a pas été possible de développer ces autres outils dans le cadre de cette thèse pour des raisons de timing et à cause de la non-continuité des trajectoires acquises. Les outils qui nous semblent les plus intéressants sont présentés ci-dessous.

Le premier outil, déjà brièvement abordé au Point 2.2.1, permettrait d'établir une distribution de longueur de trajectoire. Pour l'établir, il suffirait de couper la trajectoire chaque fois que la particule se rend dans une zone définie de la cuve. Cette zone peut être un plan de la cuve ou un volume défini de celle-ci, comme par exemple, le volume balayé par l'agitateur. Cet outil permettrait de caractériser l'écoulement étudié en mettant en évidence la diversité de « chemins » suivis par la particule avant de se rendre à nouveau dans une même zone. Cette diversité se traduit par l'étalement de la distribution des longueurs de trajectoire.

Le deuxième outil permettrait de déterminer la distribution d'âges de la particule dans une zone donnée du réacteur. En effet, le temps relatif à chaque position de la particule permet de lui associer un âge interne ; l'âge zéro étant l'entrée de la particule dans le réacteur dans le cas d'un réacteur ouvert ou le début de la trajectoire dans le cas d'un réacteur fermé. Pour différentes zones de la cuve, on peut déterminer l'âge interne de la particule lors de ses différentes visites. On établit ainsi une distribution d'âges internes. Cet outil est un moyen intéressant de caractériser le mélange dans un réacteur chimique. En effet, de nombreuses réactions sont influencées par la manière dont les réactifs sont mis en contact. Être capable de déterminer, pour chacune des zones du réacteur, si les agrégats mis en contact sont d'âges internes similaires ou non est une information précieuse relative à la précocité du mélange au sein du réacteur.

Le troisième et dernier outil permettrait de caractériser le mélange au sein de la cuve. Il serait basé sur le découpage de la trajectoire complète en plusieurs morceaux, dont la longueur correspondrait au temps nécessaire pour que la première partie de la trajectoire perde tout caractère commun avec sa seconde partie. Conceptuellement, ce traitement reviendrait à transformer « numériquement » notre système où on suit une seule particule pendant plusieurs heures en un système où on suit de nombreuses particules pendant quelques minutes. Si la trajectoire complète est suffisamment longue, il est fort probable qu'un nombre non négligeable de particules fictives passent par une même zone, comme par exemple, une zone d'injection près de la surface de la cuve. On pourrait alors repérer les pas de temps où ces

particules sont dans la zone et les labéliser comme pas de temps initiaux pour toutes les particules concernées. On pourrait ensuite étudier la manière dont ces particules s'éloignent les unes des autres au fil du temps et définir, sur base de ces données, un critère qui permettrait de définir un index de mélange et un temps de mélange.

Liste des symboles

EE 150 Mobile axial de modèle « Elephant Ear » (Applikon) diamètre d=150 mm
TTP 125 Mobile axial de modèle TTP (Mixel) et de diamètre d=125 mm

d_p	Diamètre moyen des microporteurs	[m]
DT_{cycle}	Distribution de temps mis par la particule pour réaliser le cycle « visite de la zone problématique-visite de la zone non problématique ».	[s]
DTS_{zone}	Distribution de temps de séjour de la particule dans la zone labélisée comme potentiellement problématique pour le développement cellulaire.	[s]
$DTS_{hors\ zone}$	Distribution de temps de séjour de la particule dans la zone labélisée comme non problématique pour le développement cellulaire.	[s]
M	Matrice où sont stockées les données dans Matlab®	[-]
N	Vitesse de rotation du mobile	[rpm]
N_{js}	Vitesse de rotation minimale de maintien en suspension complète des microporteurs	[rpm]
$P_{25,50,75,99}$	Percentile des distributions de temps	[s]
(r, θ, y)	Coordonnées dans le repère cylindrique dont l'origine est située sur l'axe de rotation du mobile à la même hauteur y que le repère cartésien commun dans le chapitre V.	[m, rad, m]
St	Nombre de Stokes d'une particule	[-]
t_s	Temps de séjour de la particule dans une zone à chaque visite	[s]
λ_K	Echelle de Kolmogorov	[m]
μ	Moyenne de la loi normal de la variable $\ln(t_s)$	[ln(s)]
μ_{DTS}	Moyenne de la loi log-normal des distributions de temps de séjour dans la zone et hors de la zone problématique	[s]
σ	Ecart type de la loi normal de la variable $\ln(t_s)$.	[ln(s)]
τ_N	Moyenne des contraintes normales	[N m ⁻²]
τ_f	Temps caractéristique des structures de l'écoulement	[s]
τ_p	Temps de réponse d'une particule à une modification d'orientation et de vitesse de l'écoulement	[s]
$\tau_{xx}, \tau_{yy}, \tau_{zz}$	Contraintes normales dans la direction x, y et z.	[N m ⁻²]

Table des figures

Figure VI-1 : (Gauche) Repérage de la zone problématique à partir des champs de l'échelle de Kolmogorov normée par le diamètre moyen des microporteurs (Droite) Lissage de la zone pour la rendre continue et régulière. 275

Figure VI-2 : Identification des zones (en blanc) potentiellement problématique pour le développement cellulaire. (Gauche) $\lambda_K/d_p=1$ (Milieu) $\lambda_K/d_p=2/3$ (Droite) $\lambda_K/d_p=1/2$ 275

Figure VI-3 : Distribution de temps de séjour dans la zone problématique DTS_{zone} (gauche) et dans la zone non problématique $DTS_{hors zone}$ (droit) lorsque le mobile TTP 125 tourne à la vitesse de rotation N_{js} et que le critère λ_K/d_p vaut 1/2. (Bleu) Résultats expérimentaux (rouge) Loi log-normal ajustée. 280

Figure VI-4 : Distribution de temps de séjour dans la zone problématique DTS_{zone} (gauche) et dans la zone non problématique $DTS_{hors zone}$ (droit) lorsque le mobile TTP 125 tourne à la vitesse de rotation N_{js} et que le critère λ_K/d_p vaut 2/3. (Bleu) Résultats expérimentaux (rouge) Loi log-normal ajustée. 280

Figure VI-5 : Distribution de temps de séjour dans la zone problématique DTS_{zone} (gauche) et dans la zone non problématique $DTS_{hors zone}$ (droit) lorsque le mobile TTP 125 tourne à la vitesse de rotation N_{js} et que le critère λ_K/d_p vaut 1. (Bleu) Résultats expérimentaux (rouge) Loi log-normal ajustée. 280

Figure VI-6 : (Gauche) DTS_{zone} (milieu) $DTS_{hors zone}$ (droite) DT_{cycle} obtenues lorsque le mobile TTP 125 tourne à la vitesse de rotation N_{js} et que le critère λ_K/d_p vaut 1/2. 281

Figure VI-7 : (Gauche) DTS_{zone} (milieu) $DTS_{hors zone}$ (droite) DT_{cycle} obtenues lorsque le mobile TTP 125 tourne à la vitesse de rotation N_{js} et que le critère λ_K/d_p vaut 2/3. 281

Figure VI-8 : (Gauche) DTS_{zone} (milieu) $DTS_{hors zone}$ (droite) DT_{cycle} obtenues lorsque le mobile TTP 125 tourne à la vitesse de rotation N_{js} et que le critère λ_K/d_p vaut 1. 281

Figure VI-9 : Distribution de temps de séjour dans la zone problématique DTS_{zone} (gauche) et dans la zone non problématique $DTS_{hors zone}$ (droit) lorsque le mobile TTP 125 tourne à la vitesse de rotation $2 N_{js}$ et que le critère λ_K/d_p vaut 1/2. (Bleu) Résultats expérimentaux (rouge) Loi log-normal ajustée. 285

Figure VI-10 : Distribution de temps de séjour dans la zone problématique DTS_{zone} (gauche) et dans la zone non problématique $DTS_{hors zone}$ (droit) lorsque le mobile TTP 125 tourne à la vitesse de rotation $2 N_{js}$ et que le critère λ_K/d_p vaut 2/3. (Bleu) Résultats expérimentaux (rouge) Loi log-normal ajustée. 285

Figure VI-11 : Distribution de temps de séjour dans la zone problématique DTS_{zone} (gauche) et dans la zone non problématique $DTS_{hors zone}$ (droit) lorsque le mobile EE 150 tourne à la

vitesse de rotation N_{js} et que le critère λ_K/d_p vaut 1/2. (Bleu) Résultats expérimentaux (rouge) Loi log-normal ajustée. 286

Figure VI-12 : Distribution de temps de séjour dans la zone problématique DTS_{zone} (gauche) et dans la zone non problématique $DTS_{hors\ zone}$ (droit) lorsque le mobile EE 150 tourne à la vitesse de rotation N_{js} et que le critère λ_K/d_p vaut 2/3. (Bleu) Résultats expérimentaux (rouge) Loi log-normal ajustée. 286

Figure VI-13 : Evolution avec le temps de la moyenne des contraintes normales rencontrées par la particule le long de sa trajectoire. (Haut, gauche) Mobile TTP 125, N_{js} (Haut, droite) Mobile TTP 125, 2 N_{js} , (Bas, milieu) EE 150, N_{js} 288

Figure VI-14 : Fonction de répartition et distribution de la moyenne des contraintes normales (bleu) obtenues le long de la trajectoire (rouge) obtenues à partir du champ eulérien. (Haut) Mobile TTP 125, N_{js} (Milieu) Mobile TTP 125, 2 N_{js} (Bas) Mobile EE 150, N_{js} 289

Table des tableaux

<i>Tableau VI-1 : Pourcentage du volume de la cuve couvert par la zone labélisée comme problématique pour le développement cellulaire suivant le critère λ_k / d_p choisi, le type de mobile et sa vitesse de rotation.</i>	<i>276</i>
<i>Tableau VI-2 : Valeurs des paramètres μ et σ obtenus par ajustement sur les distributions expérimentales d'une loi log-normal. Valeurs de la moyenne de la loi log-normal estimée à partir des valeurs des paramètres μ et σ.</i>	<i>279</i>
<i>Tableau VI-3 : Comparaison des distributions de temps de séjour dans la zone problématique DTS_{zone} et hors de la zone problématique $DTS_{hors\ zone}$ ainsi que les distributions de temps de cycle DT_{cycle} obtenues pour le mobile TTP 125 tournant à la vitesse de rotation N_{js} pour les critères λ_K/d_p égale à $1/2$, $2/3$ et 1.</i>	<i>282</i>
<i>Tableau VI-4 : Comparaison des distributions de temps de séjour dans la zone problématique DTS_{zone} et hors de la zone problématique $DTS_{hors\ zone}$ ainsi que les distributions de temps de cycle DT_{cycle} obtenues pour le mobile TTP 125 tournant aux vitesses de rotation N_{js} et $2 N_{js}$ et pour les critères λ_K/d_p égaux à $1/2$ et $2/3$.</i>	<i>284</i>
<i>Tableau VI-5 : Comparaison des distributions de temps de séjour dans la zone problématique DTS_{zone} et hors de la zone problématique $DTS_{hors\ zone}$ ainsi que les distributions de temps de cycle DT_{cycle} obtenues pour les mobiles TTP 125 et EE 150 tournant à leur vitesse de rotation N_{js} et pour le critère λ_K/d_p égale à $2/3$.</i>	<i>287</i>

Bibliographie

Guha, D., Ramachandran, P.A., Dudukovic, M.P., Derksen, J.J., 2008. Evaluation of large eddy simulation and euler-euler CFD models for solids flow dynamics in a stirred tank reactor. *AIChE Journal* 54, 766-778.

Guida, A., Nienow, A.W, Barigou, M., 2012. Lagrangian tools for the analysis of mixing in single-phase and multiphase flow systems. *AIChE Journal* 58, 31-45.

Khopkar, A.R., Rammohan, A.R., Ranade, V.V., Dudukovic, M.P., 2005. Gas-liquid flow generated by a Rushton turbine in stirred vessel: CARPT/CT measurements and CFD simulations. *Chemical Engineering Science* 60, 2215-2229.

Pitiot, P., 1999. Caractérisation par trajectographie tridimensionnelle du mélange dans un réacteur agité. Thèse de doctorat. Institut National Polytechnique de Lorraine. Nancy, France.

Rammohan, A.R., Kemoun, A., Al-Dahhan, H., Dudukovic, M.P., 2001. A lagrangian description of flows in stirred tanks *via* computer-automated radioactive particle tracking (CARPT). *Chemical Engineering Science* 56, 2629-2639.

Chapitre VII :

Conclusion

1	Synthèse et discussion	300
2	Perspectives.....	304
2.1	<i>Trajectographie</i>	304
2.2	<i>Simulation numérique de l'écoulement</i>	306
2.3	<i>Mot de la fin</i>	307
	Bibliographie	308

1 Synthèse et discussion

Cette thèse s'inscrit dans la thématique de la culture de cellules animales adhérentes sur microporteurs dans un bioréacteur de type cuve agitée. Ce type de procédé est en effet largement utilisée dans l'industrie pharmaceutique pour produire des composés protéinés à haute valeur ajoutée tels que les vaccins, les glycoprotéines, les anticorps monoclonaux, ...

Diverses études sur les cinétiques de croissance des cellules animales fixées sur microporteurs semblent indiquer que les performances des cultures dépendent de la distribution des conditions physico-chimiques et hydrodynamiques locales au sein du bioréacteur à cuve agitée. Or ces conditions locales dépendent du choix du design et des variables opératoires du bioréacteur. La définition du design et des variables opératoires les mieux adaptés à la culture en cuve agitée de cellules animales sur microporteurs est une tâche délicate. Elle doit, en effet, résulter d'un compromis entre un mélange suffisant pour homogénéiser la composition du milieu de culture, pour favoriser le transfert de matière vers les cellules et pour permettre le maintien des microporteurs en suspension complète, et des conditions hydrodynamiques locales suffisamment douces afin de limiter le niveau de contraintes mécaniques. Divers études montrent en effet que les cellules animales adhérentes sur microporteurs sont particulièrement sensibles à ces contraintes mécaniques car :

- Elles sont fixées sur des objets nettement plus grands que leur taille. Leur taille caractéristique devient donc le diamètre du microporteur (250 μm) et non leur diamètre propre (~ 20 μm). Or la taille des microporteurs est similaire à la taille de certains tourbillons présents au sein de l'écoulement. Ces derniers interagissent avec les cellules en générant des contraintes normales et de cisaillement à leur surface ;
- Etant fixées sur le microporteur, elles ne peuvent plus pivoter sur elles-mêmes pour réduire l'intensité de la contrainte mécanique qu'elles subissent ;
- Il faut un niveau de contrainte mécanique nettement moindre pour parvenir à les détacher des microporteurs et les rendre ainsi inactives que pour entraîner leur lyse.

Pour aider aux choix du design et des variables opératoires du bioréacteur dans ce type de procédé, nous avons développé dans cette thèse une méthodologie permettant de décrire l'influence des conditions d'agitation sur l'environnement hydrodynamique local perçu par un élément de fluide en mouvement. Pour ce faire, une description eulérienne de l'écoulement, obtenue par des mesures 3D P.I.V., a été couplée à une description lagrangienne, obtenue par des mesures de trajectographie. Cette étude a été réalisée dans un bioréacteur de 20 L, constitué d'une cuve cylindrique avec un fond ellipsoïdal et équipée de deux contre-pales.

A priori, un mobile de type axial permet de mieux concilier les besoins antagonistes cités-ci-dessus qu'un mobile radial car il génère un pompage effectif du liquide qui maintient les microporteurs en suspension complète à des vitesses de rotation relativement faibles. Cependant, la liste des mobiles axiaux disponibles est longue. Il n'était pas envisageable d'appliquer la méthodologie à chacun d'eux. C'est pourquoi dans une étape préliminaire présentée au Chapitre II, nous avons comparé sept mobiles axiaux sur bases des contraintes mécaniques qu'ils génèrent,

ces dernières étant estimées à partir de modèles et de la mesure d'une grandeur globale qu'est la puissance globale dissipée. Les mobiles sont comparés dans cette thèse sur base d'un critère original. En effet, au lieu de comparer les mobiles à même vitesse de rotation ou à même puissance dissipée, comme cela est généralement fait dans la littérature, ils sont comparés à leur vitesse minimale respective de maintien en suspension complète des microporteurs N_{js} car il s'agit d'un paramètre clé du procédé. Ils sont donc comparés à performances égales, plutôt qu'à conditions opératoires égales. Ce critère de comparaison est maintenu tout au long de la thèse. Les différentes vitesses de rotation étudiées sont exprimées comme des facteurs multiplicatifs de la vitesse de rotation N_{js} , soit $x N_{js}$. La comparaison des sept mobiles axiaux sur base de ce critère a mis en évidence que les mobiles TTP 125 (Mixel, $d/T=0.4$) et EE 150 (Applikon, $d/T=0.5$) génèrent les contraintes mécaniques les plus faibles à leur vitesse de rotation N_{js} , qui vaut respectivement 50 rpm pour le TTP 125 et 20 rpm pour le EE 150. Ils ont donc été sélectionnés pour réaliser les études eulérienne et lagrangienne de l'écoulement turbulent qu'ils génèrent.

La caractérisation eulérienne de l'écoulement turbulent généré par les deux mobiles est présentée dans le Chapitre III. Le but de cette étude est d'établir des cartes décrivant de manière quantitative la répartition spatiale de :

- La composante moyenne de l'écoulement ;
- La composante turbulente *via* ses deux grandeurs caractéristiques que sont l'énergie cinétique turbulente k et son taux de dissipation ε ;
- Les contraintes mécaniques générées par l'écoulement *via* les composantes du tenseur de Reynolds ($\tau_{ij} = \rho \overline{u'_i u'_j}$).

Ces cartes ont été déterminées à partir de la mesure de champs de vitesse par la technique expérimentale 3D P.I.V. et par le traitement des mesures acquises *via* l'approche de Reynolds.

Les résultats acquis ont pu être validés en les comparant avec des données de la littérature ou en comparant leurs valeurs moyennes avec celles obtenues à partir de grandeurs globales mesurées. La nature turbulente de l'écoulement a également été mise en évidence car l'invariance des champs rendus adimensionnels avec la vitesse de rotation du mobile a été observée.

Deux caractéristiques sont apparues systématiquement dans tous les champs étudiés :

- La première caractéristique est la non-uniformité de la distribution spatiale de l'intensité de chaque grandeur étudiée. Les champs moyens de vitesse générés par les mobiles TTP 125 et EE 150 sont tous deux composés d'un jet axial à la sortie des pales qui se divise en deux boucles de circulation, l'une inférieure et l'autre supérieure, qui couvre le reste du volume de la cuve. Les valeurs des grandeurs étudiées sont systématiquement plus intenses dans la zone couverte par le jet et dans une partie de la boucle de recirculation supérieure que dans le reste de l'écoulement.
- La seconde caractéristique est la similitude des écoulements obtenus pour les deux mobiles à leur vitesse de rotation N_{js} ou à un facteur multiplicatif de celle-ci, alors que les mobiles ont des designs très différents. Cette similitude des écoulements se marque

surtout dans la gamme des valeurs mesurées. Elle se marque moins dans leur répartition spatiale où des caractéristiques propres à chaque mobile apparaissent.

Le calcul de la répartition spatiale de l'énergie cinétique turbulente k , de son taux de dissipation ε et des composantes du tenseur de Reynolds a permis de caractériser la répartition spatiale des contraintes mécaniques au sein du bioréacteur. Cette connaissance a permis de diviser le volume de la cuve en deux régions : l'une labélisée comme « problématique pour le développement cellulaire » car les caractéristiques de l'écoulement local sont inadaptées à des cellules animales cultivées sur microporteurs et l'autre est labélisée comme « non problématique ». Cette découpe a été basée sur la répartition spatiale de l'échelle de Kolmogorov λ et non sur la répartition spatiale de la moyenne des contraintes normales τ_N car d'une part, il a été impossible de trouver dans la littérature une valeur seuil de τ_N pertinente dans le cas où les cellules sont cultivées sur microporteurs dans une cuve agitée et d'autre part, diverses études ont mis en évidence que le rapport entre l'échelle de Kolmogorov et la taille des microporteurs est un bon indicateur de l'impact potentiel du stress hydrodynamique sur le développement cellulaire. Trois valeurs du *ratio* λ_K/d_p fréquemment cités dans la littérature, ont été sélectionnés : un *ratio* de 1, un *ratio* de $\frac{2}{3}$ et un *ratio* de $\frac{1}{2}$.

L'étude présentée au Chapitre IV permet de vérifier que les gradients de concentration présents au sein de la cuve, lorsque de la soude est injectée par exemple, ont un temps d'« existence » nettement inférieur aux temps caractéristiques relatifs à une modification du métabolisme cellulaire. Cette vérification se base sur l'étude du mélange au sein du bioréacteur à l'échelle globale, par la mesure de temps de mélange, et à l'échelle locale, par la mesure de l'évolution avec le temps de champs de concentration par la technique P.L.I.F.. Il a été observé que les concentrations locales mesurées dans la cuve présentent des valeurs qui diminuent très rapidement avec le temps et que les zones concernées par des surconcentrations même modérées représentent une fraction très faible du volume du bioréacteur. Il en résulte que, dans la suite du travail, les champs de concentration sont supposés constants et uniformes au sein de la cuve agitée. Les hétérogénéités ponctuellement présentes après l'ajout de soude ne sont donc pas prises en compte dans la caractérisation Euler-Lagrange de l'écoulement.

Pour caractériser de manière lagrangienne l'écoulement au sein du bioréacteur, il faut avoir un dispositif expérimental qui permet de mesurer la trajectoire suivie par une particule au sein du bioréacteur durant une longue période. Ce type de dispositif n'existe pas « clé sur porte » et nous avons donc conçu et mis au point notre propre dispositif. Il s'agit d'un dispositif de trajectographie optique. Etant donné son caractère tout à fait original et unique, une partie importante du Chapitre V est consacrée à décrire son principe, ainsi que les outils développés pour permettre son fonctionnement.

La seconde partie du Chapitre V est consacrée à la caractérisation des trajectoires mesurées. Les trajectoires ont été acquises dans trois conditions différentes : à deux vitesses de rotation, égales à N_{js} (50 rpm) et $2 N_{js}$, pour le mobile TTP 125 et à une vitesse de rotation N_{js} (20 rpm)

pour le mobile EE 150. Les durées totales d'acquisition étaient respectivement égales à 42 h, 20 h et 12 h.

Le dispositif utilisé n'a pas permis d'obtenir une trajectoire parfaitement continue sur toute la durée de l'acquisition, car, à certains pas de temps, la particule n'a pas pu être identifiée. Néanmoins, ce caractère discontinu n'a pas empêché l'analyse des données. L'isoprobabilité de présence de la particule dans tout volume élémentaire de la cuve agitée a pu être confirmée. Il a également été constaté que les trajectoires enregistrées dans une moitié de cuve sont quasi complètes et que les informations que l'on peut en extraire sont représentatives de celles qui seraient obtenues dans l'ensemble de la cuve. La validité et la convergence des résultats obtenus par trajectographie ont pu être vérifiées car les champs de vitesse calculés à partir des trajectoires sont en très bon accord avec ceux mesurés par 3D P.I.V..

Les données eulériennes et lagrangiennes relatives à l'écoulement dans la cuve étant disponibles, elles ont été combinées afin de caractériser le lien existant entre la succession d'environnements hydrodynamiques perçus par des cellules fixées sur des microporteurs et les conditions d'agitation du bioréacteur. Cette caractérisation, présentée au Chapitre VI, repose principalement sur l'analyse de la distribution des temps de séjour de la particule dans la zone labélisée comme problématique pour le développement cellulaire DTS_{zone} , de la distribution des temps de séjour de la particule dans la zone non problématique $DTS_{hors\ zone}$, ainsi que sur l'analyse des distributions de temps mis par la particule pour réaliser un cycle complet « visite de zone problématique-visite de zone non problématique » DT_{cycle} . Les zones problématiques et non problématiques ont été identifiées au Chapitre III et leur taille dépend de la valeur choisie pour le critère λ_K/d_p , ainsi que du type de mobile et de sa vitesse de rotation. L'impact de ces trois grandeurs sur les distributions de temps a donc été analysé. Il en est ressorti que :

- Plus le critère λ_K/d_p est strict ($\lambda_K/d_p=1$ étant le plus strict), plus la taille de zone problématique est étendue et plus la particule aura de chance de passer un temps long à chaque visite dans cette zone. Puisque la position de la zone non problématique est de plus en plus cantonnée dans la partie supérieure de la cuve, la particule mettra également un temps plus long pour réaliser un cycle. Elle passera aussi proportionnellement un temps plus long dans la zone problématique que dans la zone non problématique à chaque cycle vu l'évolution du rapport des volumes des zones correspondantes.
- Lorsque la vitesse de rotation du mobile augmente, la taille de la zone problématique s'étend rapidement, cantonnant la zone non problématique dans la partie supérieure de la cuve. La conséquence est que la particule met des temps globalement plus longs pour réaliser un cycle malgré une vitesse moyenne de déplacement dans la cuve plus élevée. Elle passe également un temps plus long dans la zone problématique à chaque visite.
- La comparaison des distributions de temps obtenues pour chacun des mobiles à leur vitesse de rotation N_{js} semble indiquer que le mobile TTP 125 est mieux adapté pour la culture de cellules animales sur microporteurs que le mobile EE 150 car d'une part la particule fait globalement des cycles plus longs, *i.e.*, elle revient dans la zone

problématique à une fréquence moindre et, d'autre part, elle reste en moyenne un temps plus long dans la zone non problématique à chaque fois qu'elle la visite.

Il est donc à espérer, qu'en pratique, les tourbillons susceptibles d'endommager les cellules fixées sur les microporteurs sont ceux qui ont une taille inférieure ou égale à $d_p / 2$, car sinon cela signifierait que les cellules pourraient déjà subir un stress hydrodynamique important à la vitesse de rotation N_{js} . Il faut également, dans la mesure du possible, maintenir la vitesse de rotation du mobile à une valeur proche de la vitesse minimale de maintien des microporteurs en suspension complète N_{js} car la taille de la zone problématique, ainsi que le temps passé par la particule à chaque visite dans cette zone, augmentent rapidement pour des vitesses de rotation plus élevées. De plus, cette vitesse de rotation N_{js} semble suffisante pour assurer l'homogénéité du milieu de culture. Enfin, les deux mobiles, EE 150 et TTP 125, ont des designs très différents mais ils ont tous deux des avantages qui leur permettent d'être des mobiles adaptés à la culture de cellules animales sur microporteurs. Les résultats du Chapitre VI semblent indiquer que le mobile TTP 125 serait, du point de vue des aspects étudiés, légèrement meilleur que le mobile EE 150.

2 Perspectives

Comme tout travail dont la durée est limitée dans le temps, la recherche menée durant ces quelques années de thèse reste une modeste contribution aux recherches poursuivies à l'échelle mondiale sur le sujet. Elle est également par définition inachevée. Il faut cependant bien, un moment donné, se contraindre à présenter les résultats acquis au lieu de continuer à poursuivre toutes les idées intéressantes qui apparaissent en cours de route. Ces idées vont être présentées dans les paragraphes ci-après. Mon souhait est de pouvoir, dans le cadre de recherches postdoctorales, mettre en application une partie d'entre-elles.

2.1 Trajectographie

Le premier domaine où de nombreux travaux peuvent encore être menés concerne le dispositif de trajectographie. Ces travaux peuvent être regroupés dans trois catégories :

- L'amélioration du dispositif actuel ;
- Le développement d'outils numériques, méthodologiques et de modélisation permettant de mieux exploiter l'information contenue dans les trajectoires mesurées ;
- L'évolution du dispositif actuel vers une version qui permettrait l'étude de systèmes opaques, comme les réacteurs multiphasiques, par exemple.

Une des faiblesses du dispositif actuel est qu'il ne permet pas d'obtenir des trajectoires continues car, pour certaines positions, la particule n'est pas détectée soit parce que son niveau de gris est trop clair, soit parce qu'elle est cachée par un objet tel que le mobile ou son axe de rotation. Il est important d'éliminer ce problème. Une configuration comme illustrée à la Figure VII-1, qui met en œuvre trois caméras et trois backlights, semble une piste séduisante. En effet, dans ce type de configuration géométrique, la particule est détectable en tout point de la cuve par au moins deux caméras ; sa position peut donc être calculée partout.

De plus, dans une grande partie de la cuve, elle sera observable par les trois caméras. Cette redondance des informations pourra être judicieusement exploitée pour améliorer la précision sur la position de la particule. Ce type de configuration géométrique devrait également permettre un éclairage plus homogène de la cuve et réduire ainsi les gradients de niveau de gris présents au sein des images acquises. Cela devrait donc faciliter la détection de la particule par le logiciel de traitement des images en ligne.

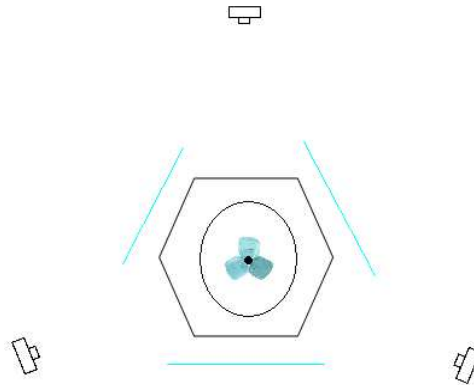


Figure VII-1 : Vue du haut d'une modification de la configuration géométrique du dispositif qui permettrait de déterminer la position de la particule dans l'ensemble du volume de la cuve car elle est observable en tout point par au moins deux caméras.

Ce dernier doit également être modifié afin de permettre d'ajuster localement le niveau de seuil en fonction de l'intensité locale de l'éclairage. Ainsi, même si le niveau de gris de la particule varie d'une zone à l'autre, elle pourra être détectée en permanence. Ces modifications sont couteuses en temps mais peu couteuses en moyens financiers, ce qui laisse espérer qu'elles pourront être effectivement réalisées. En effet, comme le dispositif actuel avait été initialement conçu pour trois caméras orientées selon les trois axes de l'espace, nous avons déjà à notre disposition trois caméras et trois backlights. Les investissements à faire seraient donc un nouvel aquarium hexagonal, un troisième pied de caméra en profilé aluminium et les coûts liés aux développements informatiques nécessaires pour ajouter l'option au logiciel de traitement en ligne des images.

Une seconde piste d'amélioration du dispositif est de réduire la taille de la particule afin qu'elle puisse suivre une plus large gamme de tailles des tourbillons et donc fournir plus d'informations sur l'écoulement. Cette amélioration requiert des modifications très importantes du dispositif. En effet, pour déterminer précisément la position d'une particule plus petite, il faudrait des caméras avec un nombre plus important de pixels. On pourrait également envisager, pour améliorer la détectabilité de la particule dans les images, se baser sur les recherches faites en P.I.V. et utiliser une particule fluorescente micrométrique éclairée par un laser volumétrique. Toutes ces options sont cependant très coûteuses. Elles requièrent donc une évaluation gain/coût avant d'être envisagées.

La caractérisation lagrangienne de l'écoulement sur base de mesure de trajectographie ne faisait pas partie du projet de thèse initial. Cette idée est arrivée assez tardivement. C'est la raison pour laquelle, dans le cadre du temps imparti à la réalisation de la thèse, nous avons pu

concevoir et mettre au point le dispositif, mais nous n'avons pas eu le temps de développer tous les outils numériques, méthodologiques et de modélisation que nous aurions souhaités, afin d'exploiter pleinement toute l'information contenue dans les trajectoires mesurées.

Or les travaux publiés dans la littérature et qui exploitent les données acquises par des trajectoires mesurées à l'aide des techniques optiques, P.E.P.T et C.A.R.P.T (Barigou *et al.*, 2003 ; Chang *et al.*, 2011 ; Fangary *et al.*, 2002 ; Guida *et al.*, 2011 ; Pitiot, 1999 ; Waters *et al.*, 2008 ; ...) mettent clairement en évidence que l'information acquise dans une trajectoire est riche et qu'en élaborant des outils d'analyse puissants, il y a moyen d'extraire des informations qui ne pourraient pas être mesurables par d'autres techniques expérimentales. De plus, le champ des applications est vaste. Nous allons donc poursuivre le développement du dispositif de trajectographie optique dans cette voie, en tentant de développer les outils analytiques qui permettront d'extraire, des trajectoires mesurées, les informations les plus pertinentes en relation avec l'objet de l'étude pour lequel ces trajectoires sont déterminées.

Le dispositif de trajectographie actuellement développé est limité à l'étude d'écoulement dans des milieux optiquement transparents. Dans le cadre de l'étude présentée dans cette thèse, cette limitation de la technique n'était pas un problème car elle avait déjà été imposée par les autres techniques expérimentales utilisées. Dans des projets futurs, cette limitation pourrait constituer un verrou. Pour contourner ce problème et permettre l'étude des écoulements multiphasiques, par exemple, il sera nécessaire de faire évoluer le dispositif de trajectographie. Une piste intéressante serait de modifier la longueur d'onde du signal utilisé pour transporter l'information. Au lieu de travailler avec de la lumière visible, on pourrait utiliser des rayons X. D'un point de vue matériel, cette adaptation nécessitera beaucoup de changements car il faudra remplacer les caméras et backlights par des sources à rayons X et des panneaux scintillants. Mais d'un point de vue méthodologie et exploitation de l'information expérimentale, cette adaptation requerra au final peu de modifications car les deux technologies (optique et RX) restent basées sur les mêmes principes de transmission des ondes lumineuses.

2.2 Simulation numérique de l'écoulement

L'ensemble des résultats présentés dans cette thèse est basé exclusivement sur des mesures expérimentales (P.I.V., P.L.I.F., trajectographie,...). C'est un choix qui a été fait. Il serait néanmoins intéressant de poursuivre la caractérisation de l'écoulement étudié dans ce travail par des simulations numériques. Dans cette optique, les travaux réalisés par Angélique Delafosse et Franck Delvigne dans le cadre d'un projet FRFC mené parallèlement à cette thèse pourraient être une source d'inspiration importante. En effet, la problématique étudiée dans le cadre de ce projet FRFC est assez similaire à celle étudiée dans le cadre de cette thèse. Il s'agit de caractériser et de modéliser l'impact des gradients de concentration en glucose qui apparaissent dans les réacteurs industriels sur le métabolisme de bactéries, comme *E.Coli*. Pour atteindre cet objectif, l'écoulement au sein du réacteur a d'abord été étudié par une approche eulérienne à l'aide de simulations C.F.D. Ces simulations servent de données de base pour l'établissement d'un modèle compartimenté rendant compte de la distribution des gradients de concentration au sein du bioréacteur. L'écoulement est ensuite étudié de manière

lagrangienne en modélisant le déplacement des bactéries au sein de ces champs de concentration par un modèle stochastique (Delafosse *et al*, 2011). Vu la similarité entre les problématiques abordées, les outils développés dans le cadre du projet FRFC peuvent être relativement facilement adaptés au cas étudié dans cette thèse.

Les simulations CFD de l'écoulement au sein du bioréacteur de 20 L, validées grâce aux nombreuses données expérimentales acquises lors de cette thèse, pourraient servir de base à la conception du modèle stochastique correspondant. Une fois validé sur base des mesures de trajectographie, le modèle stochastique pourrait être extrapolé à plus grande échelle afin d'évaluer l'impact des conditions d'agitation sur le métabolisme cellulaire dans des bioréacteurs de taille supérieure à 20 L.

2.3 Mot de la fin

Les idées présentées ci-dessus ne sont que quelques unes parmi tant d'autres. Elles mettent en évidence que de nombreuses recherches peuvent encore être faites et que la méthodologie développée dans cette thèse n'est pas cantonnée qu'à l'étude de l'écoulement dans des bioréacteurs à cuve agitée mais peut être étendue à bien d'autres domaines.

Bibliographie

Barigou, M., Fairhurst, P.G., Fryer, P.J., Pain, J.P., 2003. Concentric flow regime of solid-liquid food suspensions: theory and experiments. *Chemical Engineering Science* 58, 1671-1686.

Chang, Y.F., Ilea, C.G., Aasen, O.L., Hoffmann, A.C., 2011. Particle flow in a hydrocyclone investigated by positron emission particle tracking. *Chemical Engineering Science* 66, 4203-4211.

Delafosse, A., Delvigne, F., Collignon, M.L., Crine, M., Thonart, P., Toye, D., 2011. Modèle hybride Euler-Lagrange pour la description des hétérogénéités dans les bioréacteurs. *Récents Progrès en Génie des Procédés* 101. Edition SFGP, Paris, France.

Fangary, Y.S., Barigou, M., Seville, J.P.K., Parker, D. J., 2002. A lagrangian study of solids suspension in a stirred vessel by positron emission particle tracking (PEPT). *Chemical Engineering and Technology* 25, 521-528.

Guida, A., Nienow, A.W., Barigou, M., 2011. Mixing of dense binary suspensions: Multi-component hydrodynamics and spatial phase distribution by PEPT. *AIChE Journal* 57, 2302-2315.

Pitiot, P., 1999. Caractérisation par trajectographie tridimensionnelle du mélange dans un réacteur agité. Thèse de doctorat. Institut National Polytechnique de Lorraine. Nancy, France.

Waters, K.E., Rowson, N.A., Fan, X., Parker, D.J., Cilliers, J.J., 2008. Positron emission particle tracking as a method to map the movement of particles in the pulp and froth phases. *Minerals Engineering* 21, 877-882.

Liste des publications

1 Collaborations scientifiques

- Sept 2007 à ce jour Collaboration scientifique avec la société GlaxoSmithKline Biologicals sur la caractérisation de l'écoulement au sein des bioréacteurs à cuve agitées utilisées en culture de cellules animales sur microporteurs.
- Sept 2008-Sept 2009 Collaboration scientifique avec les sociétés ATMI-LifeSciences et GlaxoSmithKline Biologicals sur la caractérisation de l'hydrodynamique au sein des bioréacteurs à usage unique de forme parallélépipédique et agité par un mobile réalisant un mouvement pendulo-elliptique.
- Jan 2009 à ce jour Collaboration scientifique dans le cadre d'un projet FRFC avec le Centre Wallon des Bio-Industries sur l'étude des interactions entre l'hydrodynamique dans les bioréacteurs et la physiologie microbienne.
- Jan 2010 à ce jour Collaboration scientifique dans le cadre d'un projet First-Post Doc avec la société GlaxoSmithKline Biologicals sur la caractérisation et l'optimisation des cuves agitées en écoulement liquide solide.

2 Publications

2.1 Articles dans des revues scientifiques avec peer reviewing en tant que 1^{er} auteur

Collignon, M.L., Crine, M., Delafosse, A., Toye, D., 2009. Effet de la viscosité sur la structure de l'écoulement et sur le mélange dans un bioréacteur à cuve agitée utilisé en culture de cellules animales. Récents Progrès en Génie des procédés - A la croisée des sciences et des cultures, pour relever les défis industriels du XXI^{ème} siècle. Lavoisier Technique et Documentation. Paris, France.

Collignon, M.L., Delafosse, A., Crine, M., Toye, D., 2010. Axial impeller selection for anchorage dependent animal cell culture in stirred bioreactors : methodology based on the impeller comparison at just-suspended speed of rotation. Chemical Engineering Science 65, 5929-5941.

Collignon, M.L., Dossin, D., Delafosse, A., Crine, M., Toye, D., 2010. Quality of mixing in a stirred bioreactor used for animal cells culture: heterogeneities in a lab scale bioreactor and evolution of mixing time with scale up. Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement 14, 401-407.

Collignon, M.L., Delafosse, A., Crine, M., Toye, D., 2011. Reply to "Comments on Collignon et al. (Chem. Eng. Sci. 65 (2010) 5929-5941)". Chemical Engineering Science 66, 1324-1325.

Collignon, M.L., Droissart, L., Delafosse, A., Vanhamel, S., Rodriguez, R., Claes, T., Moncaubieg, F., Peeters, L., Crine, M., Toye, D., 2011. Étude de l'écoulement au sein d'un bioréacteur parallélipédique à usage unique à agitation pendulo-elliptique. Récents progrès en Génie Chimique des Procédés n° 101, Lavoisier Technique et Documentation, Paris, France.

2.2 Articles dans des revues scientifiques avec peer reviewing en tant que co-auteur

Delafosse, A., Delvigne, F., Collignon, M.-L., Crine, M., Thonart, P., Toye, D., 2010. Development of a compartment model based on CFD simulations for mixing description in bioreactors. Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement 14, 517-522.

Delafosse, A., Collignon, M.-L., Dossin, D., Crine, M., Toye, D., 2011. Estimation of the turbulent kinetic energy dissipation in a culture cell stirred tank bioreactor. Chemical Engineering Science, 66, 1728-1737.

Delvigne, F., Brognaux, A., Gorret, N., Neubauer, P., Delafosse, A., Collignon, M.-L., Toye, D., Crine, M., Boxus, M., Thonart, P., 2011. Characterization of the response of GFP microbial biosensors sensitive to substrate limitation in scale-down bioreactors. Biochemical Engineering Journal 55, 131-139

Delvigne, F., Borgnaux, A., Gorret, N., Delafosse, A., Collignon, M.L., Toye, D., Crine, M., Thonart, P., 2011. Taking into account cell membrane permeability to account for the response of GFP microbial biosensors : integrating the secretome in the scaling-up procedures. Récents progrès en Génie Chimique des Procédés n° 101, Lavoisier Technique et Documentation, Paris, France

Delafosse, A., Delvigne, F., Collignon, M.-L., Crine, M., Thonart, P., Toye, D., 2011. Modèle hybride Euler-Lagrange pour la description des hétérogénéités dans les bioréacteurs. Récents progrès en Génie Chimique des Procédés n° 101, Lavoisier Technique et Documentation, Paris, France.

2.3 Actes de conférence en tant que 1^{er} auteur

Collignon, M.-L., Crine, M., Chaubard, J.-F., Peeters, L., Dessoy, S., Toye, D., 2008. Experimental analysis by P.I.V. and P.L.I.F of the local hydrodynamic environment of animal cells cultivated in a stirred tank bioreactor. Paper presented at Biomedica, the life science summit, 16-18 April, Maastricht, Pays-Bas

Collignon, M.-L., Crine, M., Verdin, E., Chaubard, J.-F., Peeters, L., Dessoy, S., Toye, D., 2008. A study of the mixing by PIV and PLIF in bioreactor of cells animals culture. Paper presented at Sixth International Symposium on Mixing in Industrial Process Industries, 16-21 August, Niagara on the Lake, Canada, Ontario.

Collignon, M.-L., Crine, M., Delafosse, A., & Toye, D., 2009. Effet de la viscosité sur la structure de l'écoulement et sur le mélange dans un bioréacteur à cuve agitée utilisé en culture de cellules animales. Paper presented at 12ème congrès de la Société Française de génie des procédés, 14-16 October, Marseille, France.

Collignon, M.-L., Dossin, D., Crine, M., Chaubard, J.-F., Peeters, L., Dessoy, S., Toye, D., 2009. Study of the mixing time evolution during the scale-up of an animal cells culture in a stirred tank bioreactor. Paper presented at Biomedica, the life science summit, 1-2 April, Liège, Belgique.

Collignon, M.-L., Droissart, L., Delafosse, A., Vanhamel, S., Rodriguez, R., Claes, T., Moncaubeig, F., Peeters, L., Crine, M., Toye, D., 2010. Study of hydrodynamics inside a single use parallelepiped stirred bioreactor equipped with an elliptic motion paddle. Paper presented at: 19th Congress of Chemical and Process Engineering(CHISA) ; 7th European Congress of Chemical Engineering (ECCE-7), 28 August – 1 September, Prague, République Tchèque.

Collignon, M.-L., Delafosse, A., Crine, M., Toye, D., 2011. Study of turbulent flow inside a stirred tank used in animal cell culture. Paper presented at 7th International Symposium on Mixing in Industrial Processes, ISMIP 7, 18-21 September, Pekin, Chine.

Collignon, M.-L., Droissart, L., Delafosse, A., Vanhamel, S., Rodriguez, R., Claes, T., Moncaubeig, F., Peeters, L., Crine, M., Toye, D., 2011. Etude de l'écoulement au sein d'un bioréacteur parallélépipédique à usage unique à agitation pendulo-elliptique. Paper presented at 13ème Congrès de la Société Française du Génie des Procédés, 29 November -1 December, Lille, France.

Collignon, M.-L., Degand, A., Delafosse, A., Delvigne, F., Thonart, P., Toye, D., 2011. Mise au point d'un dispositif de trajectographie optique pour l'étude lagrangienne des écoulements dans une cuve agitée utilisée dans l'industrie pharmaceutique. Paper presented at 13ème Congrès de la Société Française du Génie des Procédés, 29 November -1 December, Lille, France.